

**Universidad Autónoma de Madrid**

Departamento de Bioquímica



**Nuevos mecanismos de regulación de las funciones  
celulares de la proteína contráctil miosina II no  
muscular**

Tesis doctoral

**Rocío Aguilar Cuenca**

Madrid, 2017

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

**Universidad Autónoma de Madrid**



# **Nuevos mecanismos de regulación de las funciones celulares de la proteína contráctil miosina II no muscular**

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

**Rocío Aguilar Cuenca**

para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de la Tesis: Miguel Vicente Manzanares.

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa.

Madrid, 2017

Miguel Vicente-Manzanares Doctor en Ciencias Químicas y Profesor del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que Rocío Aguilar Cuenca, licenciada en Biología por la Universidad Málaga, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

**Nuevos mecanismos de regulación de las funciones celulares de la proteína contráctil miosina II no muscular**

Revisado este trabajo, el que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y autoriza su presentación para ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid a 08 de Mayo de 2017.

**Fdo. Dr. Miguel Vicente-Manzanares**

*A mis amigos,*

*A mi familia,*

*A Eugenio*

# Agradecimientos

# Resumen

## Resumen

La generación de fuerza mecánica es un proceso esencial en la morfogénesis de los tejidos, las interacciones intercelulares y los procesos de migración y diferenciación. A nivel celular, las fuerzas mecánicas dirigen la proliferación celular, controlan el movimiento y participan en los procesos de muerte celular programada. La mayor parte de la fuerza mecánica generada en una célula emerge de la actividad contráctil de motores moleculares de la superfamilia de las miosinas. En tejidos no musculares, el principal generador de fuerza mecánica es la miosina no muscular de clase II (NMII), que forma estructuras poliméricas (mini-filamentos), que se asocian a los microfilamentos y los desplazan, generando trabajo mecánico. Debido a la importancia de su función, la NMII tiene unos mecanismos muy sofisticados de regulación que controlan su asociación a los microfilamentos, su estado de polimerización en mini-filamentos para generar estructuras dinámicas y transitorias, o estables y resistentes, y su actividad contráctil propulsada por su capacidad para hidrolizar ATP. Durante los últimos 40 años, más de 7000 artículos han contribuido a descifrar muchos de estos mecanismos, incluyendo fosforilaciones en la cadena reguladora que controlan el estado conformacional de la molécula; asociaciones inter- e intracatenarias que regulan la formación de filamentos; y muchos otros. En este trabajo de Tesis doctoral, hemos estudiado aspectos de la regulación de la NMII poco caracterizados que sin embargo controlan críticamente su función a nivel celular. En la primera parte del trabajo, hemos caracterizado la función de un tipo de fosforilación de la cadena ligera (fosforilación en tirosina) descrito por el premio Nóbel Edwin Krebs hace más de 30 años, cuya función a nivel celular permanecía sin describir. Este trabajo establece un nuevo mecanismo de regulación de la función de NMII que depende de la fosforilación de Tyr155 y que regula no su función, sino su disponibilidad para ensamblarse de manera eficiente y formar estructuras estables que definen parámetros claves de la arquitectura celular. En la segunda parte, hemos separado las funciones celulares que dependen de la capacidad contráctil de la NMII de aquellas que dependen de su capacidad entrecruzadora de los microfilamentos. Esta parte del trabajo establece que los dos parálogos principales de la NMII expresados en la mayoría de tejidos, NMII-A y NMII-B, cooperan para transmitir el trabajo mecánico a la matriz extracelular mediante la transmisión de tensión mecánica a través de los haces de actomiosina. Este trabajo también establece que la arquitectura del entrecruzamiento de los microfilamentos determina la eficiencia de aplicación de la tracción y que existen funciones que dependen absolutamente de la actividad contráctil de la NMII-A, como es la retracción del polo posterior durante la migración y la segregación espacial de las isoformas en células polarizadas.

# Summary



## Summary

The generation of mechanical force is an essential process in tissue morphogenesis, cell-cell interactions and processes such as migration and differentiation. At the cellular level, mechanical forces direct cell proliferation, control movement, and participate in programmed cell death. The majority of the mechanical force generated in a cell emerges from the contractile activity of the molecular motors of the myosin superfamily. In non-muscle tissues, the main generator of mechanical force is the molecular motor non-muscular class II myosin (NMII), which forms polymeric structures (mini-filaments) associated with microfilaments, applying force to displace them, thus generating mechanical work. Due to the importance of its function, NMII has very sophisticated mechanisms of regulation that control its association to microfilaments and its state of polymerization in mini-filaments to generate structures that are dynamic and transient, or stable and resistant. Another level of regulation is its ability to hydrolyze ATP to fuel its contractile propulsive activity. Over the past 40 years, more than 7,000 articles have contributed to deciphering many of these mechanisms, including phosphorylation in the regulatory chain that control the conformational state of the molecule; inter- and intra-catenary associations that regulate filament formation. In this PhD dissertation, we have studied less characterized aspects of the regulation of the NMII that nonetheless critically control its function at a cellular level. In the first part of the work, we characterized the cellular function of a type of light chain phosphorylation (tyrosine phosphorylation) first described by Nobel Prize Awardee Edwin Krebs more than 30 years ago. This work establishes a novel mechanism of regulation of the function of NMII that depends on the phosphorylation of Tyr155 and that does not regulate its function, but its availability to assemble in an efficient way and to form the structures that define key parameters of the cellular architecture. In the second part, we have separated the cellular functions that depend on the contractile capacity of the NMII from those that depend on their microfilament cross-linking capacity. This part of the study demonstrates that the two major NMII paralogues expressed in most tissues, NMII-A and NMII-B, cooperate to transmit mechanical work to the extracellular matrix by transmitting mechanical stress through the bundles of actomyosin. This work also shows that the crosslinking architecture of microfilaments determines the effectiveness of traction generation and that some functions, such as posterior pole retraction during migration or isoforms spatial segregation in polarized cells, absolutely depend on the contractile activity of NMII-A.

# Índice

Agradecimientos

Resumen

Summary

Indice

Clave de abreviaturas 7

1. Introducción 11

1.1 Antecedentes .....	11
1.2. Estructura y mecanismo funcional de la NMII .....	13
1.3. Expresión y función tisular de los parálogos NMII .....	15
1.4. Regulación.....	16
1.5. Funciones celulares de la NMII .....	19

2. Objetivos 33

3. Materiales y métodos 37

3.1 Plásmidos .....	37
3.2 Anticuerpos .....	40
3.3. Reactivos .....	41
3.4. Cultivos celulares .....	42
3.5. Transfección .....	43
3.6. Inmunofluorescencia .....	43
3.7. Producción de RLC recombinante y ensayo <i>in vitro</i> quinasa .....	43
3.8. Ensayo de fraccionamiento celular .....	44
3.9. Inmunoprecipitación.....	45
3.10. Fabricación de sustratos de flexibilidad controlada para microscopía de fuerza de tracción (TFM) .....	45
3.11. Microscopia confocal .....	47
3.12. Análisis cuantitativo de adhesiones.....	48

3.13. Análisis de los vídeos de TFM .....	48
3.14. Evaluación de la migración celular por microscopía de tiempo retardado ....	49
3.15. Medida de recuperación de fluorescencia tras foto-extinción ( <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP</i> ).....	49
3.16. Fosfoproteómica basada en espectrometría de masas .....	50

## 4. Resultados

55

4.1.1. La cadena reguladora de la miosina no muscular de clase II ( <i>Regulatory myosin Light Chain, RLC</i> ) se fosforila en tirosina en respuesta a factores de crecimiento. ....	55
4.1.2. La mutación de Tyr155 a un residuo no fosforilable inhibe la localización de la RLC en los haces de actomiosina.....	63
4.1.3. La fosforilación de la RLC en Tyr 155 permite la generación de haces de actomiosina que definen la polaridad anteroposterior de las células migratorias.....	67
4.1.4. La fosforilación Tyr 155 permite la interacción de la RLC con el hexámero de NMII independientemente del sitio de activación canónico T18/S19 .....	74
4.2.1. Los parálogos NMII-A y NMII-B contribuyen diferencialmente a la generación y transmisión de tracción de células CHO.K1 a sustratos flexibles cubiertos con fibronectina .....	81
4.2.2. Un mutante deficiente en contracción de MHCII-A restaura la tracción celular y la maduración de las adhesiones de manera dependiente de NMII-B.....	85
4.2.3. El mutante N93K MHCII-A promueve la estabilidad del filamento de actomiosina.....	88
4.2.4. El mutante N93K de MHCII-A facilita el ensamblaje de NMII-B, mejora la tracción dependiente de NMII-B y ralentiza el intercambio de componentes adhesivos en adhesiones focales .....	91
4.2.5. NMII-A no contráctil no restaura la retracción de la parte posterior de la célula durante la migración celular .....	94
4.2.6. $\alpha$ -actinina promueve la elongación de la adhesión en ausencia de NMII-A pero no soporta la transmisión de fuerza para la tracción celular .....	96
4.2.7. La tropomiosina induce el alineamiento de mini-filamentos de NMII-B para iniciar la maduración de la adhesión y la restauración parcial de la tracción celular .....	101

<b>5. Discusión</b>	<b>105</b>
5.1.1. Mecanismo molecular de estabilización de NMII por fosforilación de RLC en Y155 .....	106
5.1.2. Mecanismo molecular de fosforilación de la RLC en Y155 .....	108
5.1.3. Efectos a nivel celular y tisular de la fosforilación en Y155 .....	110
5.1.4. Posibles funciones de la fosforilación de la RLC en Y142.....	111
5.2.1. El entrecruzamiento no contráctil de los microfilamentos mejora la transmisión de la fuerza mecánica generada por la NMII y su conversión en tracción. ....	114
5.2.2. La geometría de la estabilización de la actina es crucial para la maduración de los contactos adhesivos. ....	116
5.2.3. Segregación molecular de los parálogos de NMII y modelos de enfermedad humana .....	117
 <b>6. Conclusiones</b>	 <b>121</b>
 <b>7. Referencias</b>	 <b>125</b>
 <b>8. Anexos</b>	 <b>137</b>
8.1. Información suplementaria.....	137
8.2 Publicaciones relacionadas con este trabajo.....	138
8.3 Otras publicaciones .....	139

# Clave de abreviaturas

## Clave de abreviaturas

**2/3 D:** dos/tres Dimensiones.

**A, Ala:** Alanina.

**Aa:** Amino-Ácidos.

**AACT:**  $\alpha$ -Actinina

**Abi1:** Proteína de interacción con quinasa Abelson-1

**ADF:** Factor de despolimerización de actina

**ADP:** Adenosín difosfato

**Arp2/3:** Proteínas relacionadas con la actina

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**BRCA1:** Cáncer de mama1

**CAD:** Disociación activada por colisión.

**Cdc42:** Proteína del ciclo de división celular 42.

**Cdc42BP:** Proteína de unión a Cdc42

**CitK:** Citrón quinasa

**CKII:** Casein quinasa 2

**CTN:** Cortactina

**DFNA4:** Sordera autosómica dominante 4

**EGFR:** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ELC:** Cadena ligera esencial.

**ERM:** Ezrina/radixina/moesina

**FRAP:** Recuperación de la Fluorescencia después de la fotoextinción

**FLN:** Filamina

**GFP:** Proteína fluorescente verde

**GSK3:** Glicógeno sintasa quinasa 3

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico 1

**Mg<sup>2+</sup>:** Magnesio

**MHCII:** Cadena pesada de Miosina II

**MHCII-A/B/C:** Cadena pesada de Miosina II A/B/C

**MLC:** Cadena ligera de miosina

**MLCK:** Quinasa de la cadena ligera de Miosina.

**MRCK:** Quinasa de dominio superenrollado relacionada con la distrofia miotónica

**MS/MS:** Espectrometría de masas en tándem

**MTOC:** Centro Organizador de microtúbulos

**MYPT1:** Subunidad1 de la fosfatasa específica de la Miosina

**NMII:** Miosina II No Muscular

**NMII-A/B/C:** Miosina II no muscular, parálogos A/B/C

**P130CAS:** Sustrato 130 fosforilado asociado a Crk

**PAA:** Poliacrilamida

**PAK:** Quinasa 1 activada por proteína P21

**PAR:** PARTioning

**PDGFR:** Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**Pi:** Fosfato inorganico

**PKC:** Proteína quinasa C

**Rac:** Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras

**RhoA:** Miembro A de la familia de genes homólogos de Ras

**RLC:** Cadena ligera reguladora

**ROCK:** Quinasa de dominio superenrollado asociada a RhoA

**RTK:** Receptores tirosina quinasa

**S, Ser:** Serina

**S100A4:** Proteína A4 de unión a calcio S100

**Scar:** Supresor del receptor cAMP

**SD:** Desviación estándar

**SE:** Error estándar

## CLAVE DE ABREVIATURAS

---

**shRNA:** Pequeño RNA horquillado

**T, Thr:** Treonina.

**TBS:** Buffer salino tris.

**TIRF:** Fluorescencia de reflexión interna total

**TPM:** Tropomiosina

**TRPM6/7:** Receptor iónico de potencial transitorio relacionados con melastatina 6 y 7

**WAVE:** Proteína de la familia de síndrome Wiskott-Aldrich

**Y/Tyr 142:** Tirosina 142

**Y/ Tyr155:** Tirosina 155

**ZIPK:** Quinasa de unión a dominios cremallera de leucinas



# Introducción

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes

Las miosinas son una familia multigénica de motores moleculares de unión a actina. Varios de sus miembros se expresan ubicuamente y se activan en respuesta a diferentes rutas de señalización permitiendo a la célula controlar diversos aspectos estructurales y mecánicos relacionados con la organización y dinámica del citoesqueleto. La primera mención de la miosina en la bibliografía científica aparece en 1864. El investigador alemán Willy Kühne purificó una sustancia viscosa del músculo, que denominó “miosina”. Kühne postuló que estaba relacionada con las propiedades contráctiles del músculo (1). Posteriormente, esta sustancia se identificó enzimáticamente como una ATPasa compuesta por dos tipos de sustancias, actomiosina y actina (2).

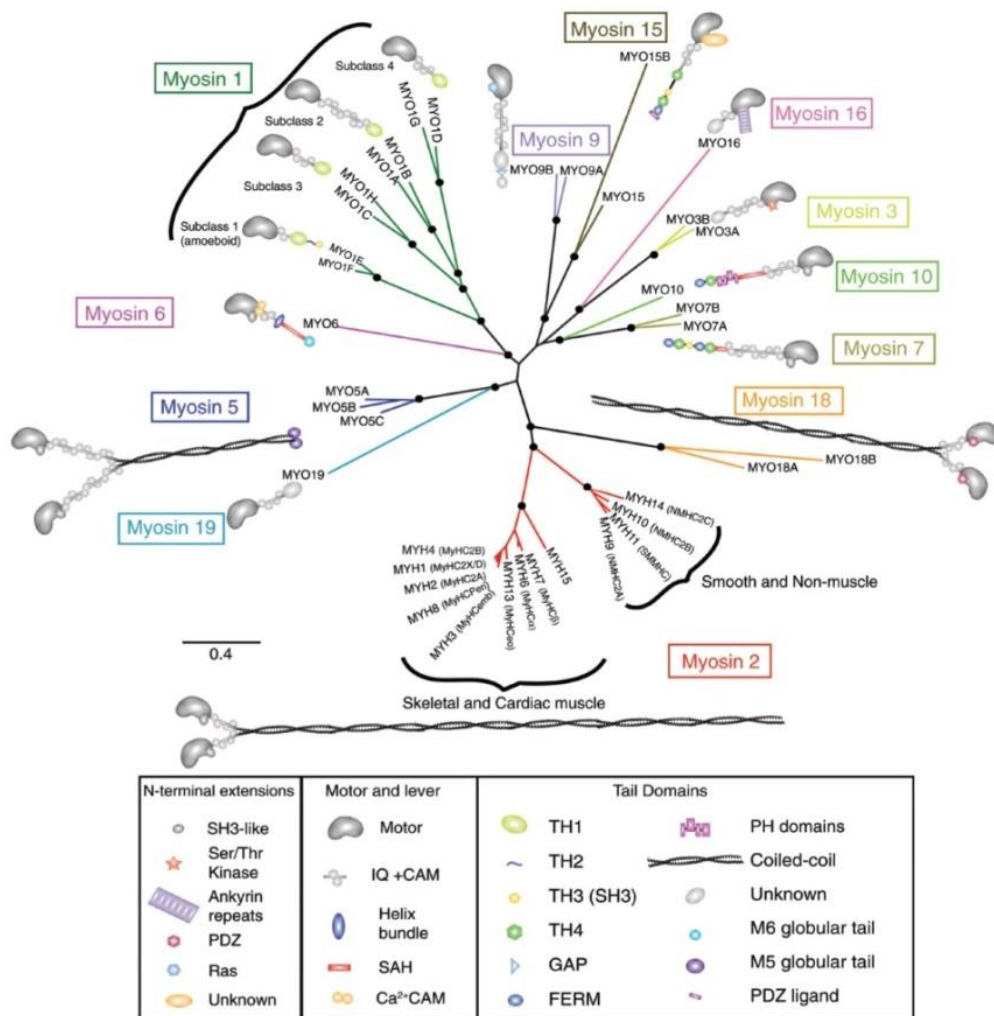
Estudios posteriores identificaron sus partes funcionales, incluyendo una cadena pesada que contenía la actividad ATPasa y varias cadenas ligeras asociadas, así como el ciclo de asociación/disociación de la miosina a la actina. En 1969, estos descubrimientos permitieron a Huxley desarrollar un modelo de contracción muscular denominado modelo de “puente cruzado”, de acuerdo con el cual la miosina se une transitoriamente a la actina dependiendo de si contiene ATP o ADP. La hidrólisis del ATP permite un cambio conformacional que aplica fuerza mecánica al filamento de actina al que está unida, moviéndolo (3). La precisión molecular de este descubrimiento propulsó el interés por la miosina para explicar los fenómenos contráctiles en células no musculares. Esto llevó a la rápida identificación de la existencia de miosinas en células no musculares, como plaquetas (4) y amebas (5, 6). Los esfuerzos de este periodo permitieron descubrir que la miosina se expresaba tanto en los tejidos no musculares de mamíferos como en eucariotas unicelulares.

A lo largo del tiempo han ido surgiendo una gran diversidad de miosinas implicadas en un amplio rango de procesos que implican acción mecánica. Algunas de ellas se expresan en gran diversidad de organismos, mientras que otras han sido identificadas hasta ahora en un solo organismo.

Según las relaciones filogenéticas derivadas de la comparación de la secuencia de aminoácidos del dominio motor, que está muy conservado, o del dominio C-terminal, que es muy variable y determina una gran diversidad, se pueden distinguir aproximadamente 30 clases de miosinas. Estas se clasifican en:

- Miosinas convencionales: Forman el grupo de las denominadas miosinas de clase II. Son aquellas que forman filamentos en células musculares y no musculares.
- Miosinas no convencionales: En este grupo se encuentran todas las miosinas que no forman parte de las miosinas de clase II. Pueden ser monoméricas o diméricas, y se postula que no forman filamentos como las miosinas convencionales (7).

Por ejemplo, en humanos hay 39 genes diferentes que codifican para miosinas, dando lugar a 12 clases diferentes (**Figura I1**). Este trabajo de Tesis Doctoral se centra en las miosinas convencionales (clase II) no musculares.



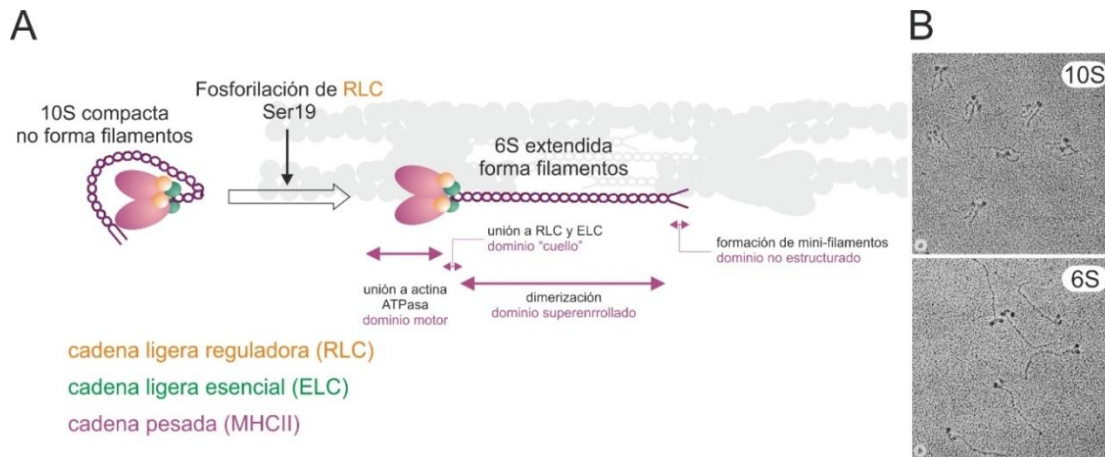
**Figura I1. Representación de la familia de miosinas en humanos.** Los 39 genes que codifican para miosinas en humanos se organizan en 12 clases diferentes. Solo tres clases de miosina contienen dominios superenrollados en su segmento C-terminal que permiten la dimerización (miosinas de clase 2, 5 y 18). El resto de las miosinas presentan una gran variedad de motivos estructurales y funcionales en sus dominios C-terminal que se indica en la clave mostrada en la parte inferior de la figura. Existe también variabilidad en los dominios N-terminal antes del dominio motor. Tres clases de miosina contienen un dominio SAH ( $\alpha$ -hélice única) (miosinas 6, 7 y 10). Panel original de (8).

## 1.2. Estructura y mecanismo funcional de la NMII

Todas las miosinas II convencionales, ya sean aisladas de músculo esquelético, liso o de músculo de invertebrado, no muscular o de organismos unicelulares son funcionalmente un hexámero compuesto por dos cadenas ligeras reguladoras (RLC), dos cadenas ligeras esenciales (ELC) y dos cadenas pesadas (MHC) (**Figura I2**). En el caso de las miosinas convencionales no musculares (NMII), ambos tipos de cadenas ligeras desempeñan un papel estructural, pero la RLC controla además la activación de la molécula por fosforilación.

Genéticamente, la ELC está codificada por un solo gen (*Myl6*); la RLC está codificada en tres genes que producen una RLC típica de músculo liso (gen *Myl9*) (9) y dos RLC no musculares (genes *Myl12A* y *Myl12B*). Por su parte, existen tres isoformas de cadena pesada, II-A, II-B y II-C, codificadas por los genes *Myh9*, *Myh10* y *Myh14*, respectivamente. Es importante recalcar varios aspectos funcionales esenciales: en primer lugar, las cadenas pesadas no heterodimerizan, formando exclusivamente hexámeros II-A o II-B o II-C. Por el contrario, las tres cadenas pesadas interactúan indistintamente con dos RLC (cualquier isoforma) y dos ELC. A nivel de nomenclatura, las distintas isoformas de la MHCII determinan el tipo de parólogo: por ejemplo, el parólogo NMII-A está compuesto por 2×MHCII-A+2×RLC +2×ELC.

La molécula de MHCII actúa como molde del parólogo funcional NMII y contiene varios dominios funcionales: el dominio N-terminal, el dominio “cuello” y el dominio C-terminal, que a su vez se divide en un segmento largo superenrollado y un corto dominio desestructurado en la porción terminal. El dominio N-terminal contiene el dominio de unión a actina y la actividad ATPasa, que permiten el deslizamiento de los filamentos de actina. El dominio “cuello” actúa de sitio de unión a las cadenas ligeras y permite el movimiento conformacional de la cabeza para generar el desplazamiento de los filamentos. Por otra parte, la porción superenrollada del dominio C-terminal participa en la dimerización de la molécula (interacción entre las dos subunidades MHCII), mientras que el segmento desestructurado controla las interacciones laterales entre parálogos para la formación de unidades multi-hexaméricas de orden superior, también llamadas “mini-filamentos”. En general, los dos últimos dominios definen las propiedades funcionales primarias de una miosina, incluyendo su capacidad para formar mini-filamentos, la localización celular y sus funciones celulares.



**Figura 12. Miosina II no muscular (NMII).** Estructura del hexámero de NMII (A) y micrografías electrónicas de sombra rotacional de la conformación de la NMII (B). Imágenes representativas de dos conformaciones del hexámero de NMII 10S, el cual es la forma incompetente para el ensamblaje, y 6S, la forma competente para el ensamblaje. En (A), la forma 6S es representada asociada a filamentos de miosina. Panel B adaptado de referencia (10).

A nivel celular, NMII adopta dos configuraciones, o conformaciones (**Figura 12**): Compacta o auto-inhibida (10S) y extendida (6S) (11). Se postula que mientras la conformación 10S no puede formar filamentos, la conformación 6S los forma rápidamente, hasta el punto que no se ha observado NMII en conformación 6S fuera de un filamento. Imágenes de microscopía electrónica de la conformación de NMII 10S (**Figura 12**) muestran que los dos dominios motores interactúan de forma asimétrica y las colas se pliegan en dos puntos para interactuar fuertemente con el dominio motor, estabilizando la interacción motor-motor (12) y compactando aún más la molécula, evitando el ensamblaje al filamento. La fosforilación de RLC en Ser19 revierte esta auto-inhibición, alterando alostéricamente la restricción conformacional impuesta por la interacción motor-cola, desplegando la molécula, que es ahora competente para ensamblarse con otros dímeros y formar mini-filamentos (10, 12). Los efectos de la defosforilación de RLC son opuestos. Además de revertir la auto-inhibición de la NMII, la fosforilación de la Ser-19 también aumenta la actividad ATPasa de la cadena pesada en la forma ensamblada, promoviendo así la generación de fuerza contráctil sobre la actina (10, 13). La repetición de estos ciclos junto con el hecho de que múltiples dominios motores están unidos simultáneamente a diferentes filamentos de actina genera el desplazamiento de los mismos con respecto a los mini-filamentos de miosina, generando trabajo mecánico (14).

### 1.3. Expresión y función tisular de los parálogos NMII

La existencia de tres parálogos funcionales de NMII en células humanas implica que ciertas funciones serán redundantes, pero otras serán específicas y esenciales. La existencia de síndromes genéticos relacionados con alteraciones en la expresión y función de MHCII-A y II-C así como el desarrollo de animales genéticamente modificados y el uso de herramientas moleculares tales como siRNA específicos de isoforma ha permitido desentrañar algunas de las funciones especializadas de los distintos parálogos.

Mutaciones asociadas al gen *Myh9* generan cuadros de deficiencia en la expresión y/o función de NMII-A. Este grupo de enfermedades genéticas se conocen colectivamente como síndromes *Myh9*, e incluyen el síndrome de May-Hegglin y las anomalías de Epstein, Fetchner y Sebastian (15). Los síndromes *Myh9* se caracterizan por la aparición de inclusiones leucocitarias (cuerpos de Döhle), macrotrombocitopenia, nefritis, sordera y cataratas. Estos síndromes están causados por mutaciones en el gen que codifica para cadena pesada de miosina IIA no muscular. Algunas de estas mutaciones afectan al dominio de dimerización, mientras que otras, cuyas manifestaciones son más severas, se localizan en el dominio motor(16). Por otra parte, se ha descrito recientemente un caso de mutación asociada al gen *Myh10*, que causa graves anormalidades morfológicas durante el crecimiento (17). Finalmente, una mutación en el gen *Myh14* es responsable de un síndrome de sordera congénita conocida como DFNA4 (18).

Por otra parte, los ratones genéticamente deficientes para MHCII-A (*Myh9*<sup>-/-</sup>) mueren en el estadio E6.5, siendo el déficit de esta proteína letal para el desarrollo debido a defectos graves en la integridad de las capas primordiales que dan lugar a los órganos internos (19). Por el contrario, los ratones *Myh10*<sup>-/-</sup>, deficientes para MHCII-B tienen un desarrollo relativamente normal, pero mueren entre los estadios E14.5 y E19, con defectos en la formación del septo cardíaco e hidrocefalia (20, 21). Finalmente, los ratones deficientes en MHCII-C (*Myh14*<sup>-/-</sup>) no presentan deficiencia alguna excepto en caso de hipomorfismo del gen *Myh10* (*Myh14*<sup>-/-</sup>*Myh10*<sup>-/-</sup>). Estos ratones son fenotípicamente similares a los *Myh10*<sup>-/-</sup> (22).

A nivel de expresión tisular, MHCII-A se expresa virtualmente en todos los tejidos, de manera similar a MHCII-B. Algunas excepciones son las plaquetas, eritrocitos y neutrófilos, así como algunas células glomerulares y vestibulares del oído interno, que sólo expresan MHCII-A (23). Por su parte, en neuronas de hipocampo de ratón sólo se detectan MHCII-B y MHCII-C (M. Vicente-Manzanares, datos no publicados). El perfil de

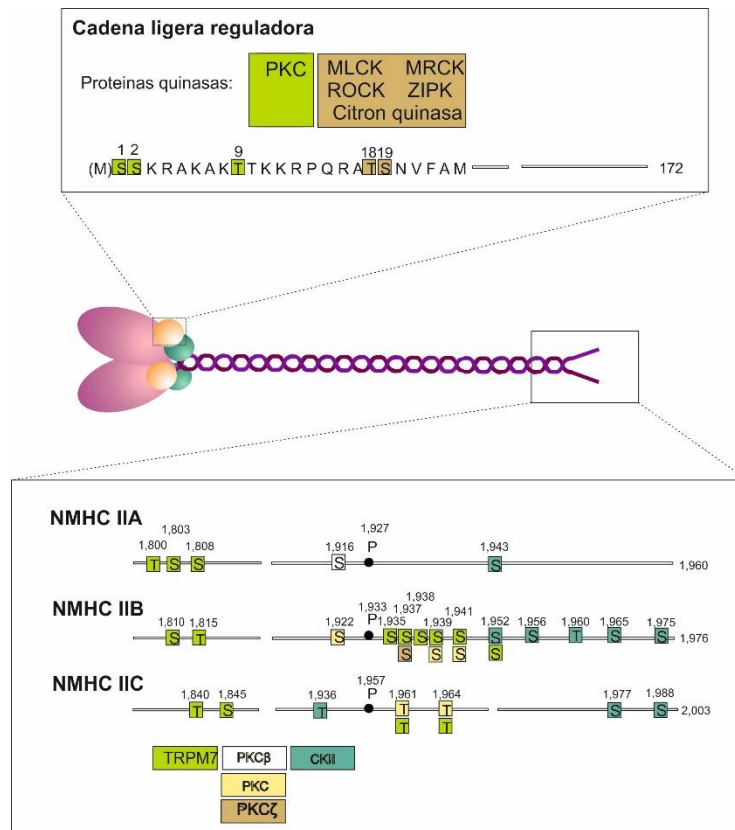
expresión de MHCII-C es más restringido, con preponderancia en músculo esquelético, corazón y otros órganos, como pulmón, intestino, riñón e hígado.

#### 1.4. Regulación

La regulación de la miosina ocurre a tres niveles diferentes: **1) Transcripcional.** Incluye regulación de la expresión del gen de miosina y de su corte y empalme (“*splicing*”) alternativo. Este mecanismo, aunque crucial a nivel sistémico, no es el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. Otros estudios han abordado este aspecto en profundidad (24-26); **2) Unión a un efector o sustrato.** Este mecanismo se basa en la disponibilidad de ATP (como sustrato de actividad ATPasa), filamentos de actina (como proteína de unión por el dominio N-terminal) y de otros hexámeros (como elementos de unión por el dominio C-terminal), y depende principalmente de las concentraciones locales de estos elementos; **3) Modificaciones post-traduccionales.** Este último mecanismo incluye modificaciones covalentes, por ejemplo fosforilación (tanto en la MHCII como en la RLC, que alteran la actividad de la miosina produciendo la conversión de un estado inactivo a un estado activo o viceversa).

Hasta el momento, los residuos fosforilables más importantes se localizan en la MHCII y la RLC (**Figura I3**). Aunque se han descrito fosforilaciones de la MHCII en el dominio motor (27), un gran número de residuos fosforilables se sitúan en el dominio C-terminal de los dominios superenrollado y desestructurado. Estas fosforilaciones conforman un mecanismo regulador que regula negativamente la nucleación y/o el ensamblaje de mini-filamentos. La base molecular de este efecto se basa en la existencia de motivos alternos cargados positiva y negativamente, que interaccionan en trans con los dominios equivalentes de otro hexámero, constituyendo además la base molecular de la capacidad de homodimerización, pero no heterodimerización, de los hexámeros de NMII (28). La introducción de carga negativa altera esta cuidadosa distribución de carga, dificultando las interacciones laterales entre los dominios C-terminal de los hexámeros. Estas fosforilaciones son inducidas principalmente por tres tipos de proteína quinasas: PKCs, canales de calcio activados por estrés (TRPM6/7), y casein quinasas (CK-II). Estos tres grupos de proteínas son capaces de fosforilar diversos residuos de Thr y/o Ser en esta región de las tres isoformas de la MHCII, inhibiendo su capacidad para formar filamentos de orden superior (29-31).





**Figura I3. Regulación por fosforilación de la NMII.** La parte superior del panel representa las fosforilaciones del hexámero NMII en la cadena ligera reguladora (RLC, se muestra la secuencia del aminoácido 1 al 25) y las quinasas que ejecutan estas fosforilaciones. La parte inferior representa la fosforilación en la porción C-terminal de las tres isoformas de la cadena pesada (NMHCII) y las quinasas que ejecutan estas fosforilaciones. En la parte superior, se indican las quinasas que fosforilan RLC en Ser1/2/Thr9 (Proteína Quinasa C, PKC); y en Thr18/Ser19, que incluyen MLCK (quinasa de la cadena ligera de miosina); ROCK (Quinasa de dominio superenrollado asociada a RhoA); citrón quinasa; MRCK (Quinasa de dominio superenrollado relacionada con la distrofia miotónica) y ZIPK (Quinasa de unión a dominios cremallera de leucina). En la parte inferior, se muestran los residuos regulables por fosforilación en las tres isoformas de NMHCII. Las quinasas son PKC, CKII (caseína quinasa-II) y TRPM6/7 (receptores de potencial transitorio relacionados con melastatina 6 y 7). La fosforilación de NMHCIIA por CKII en Ser1943 bloquea la unión de S100A4, que inhibe el ensamblaje de filamentos. Nota: cada sitio de fosforilación y quinasa que lo fosforila se representa con el mismo color. Imagen basada en (32).

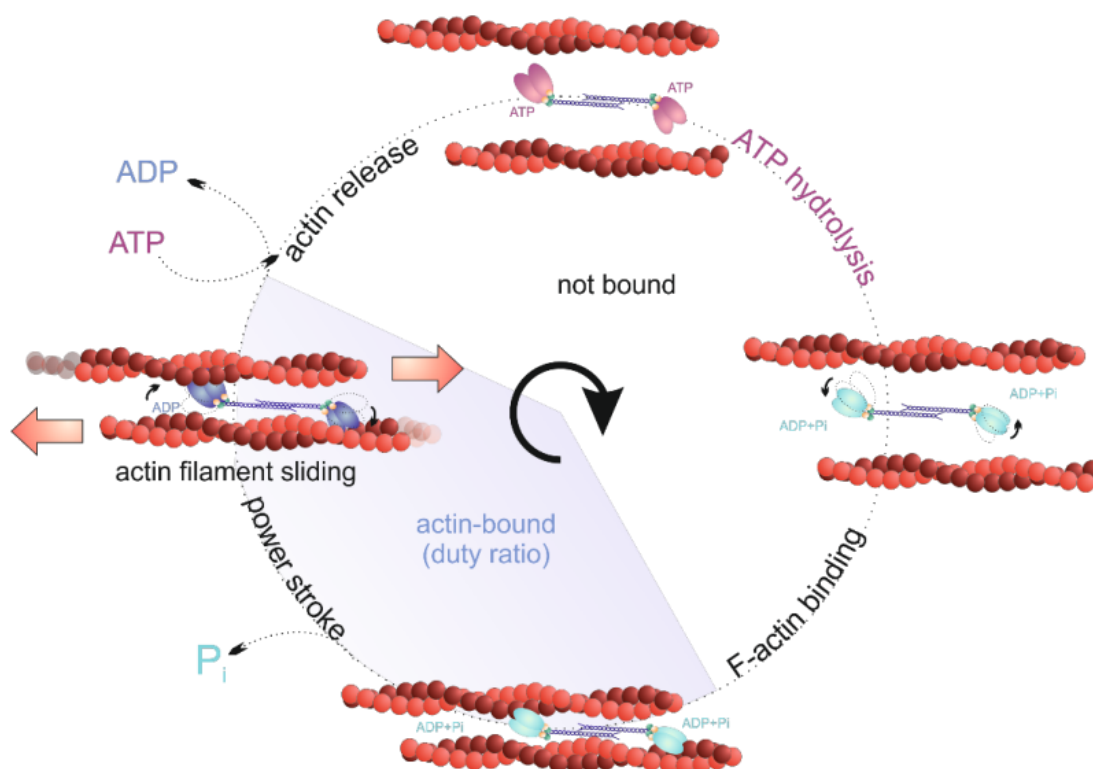
Las fosforilaciones de la cadena ligera reguladora, en respuesta señales que emanan de la activación de receptores en la membrana plasmática, es el principal mecanismo de activación de la NMII. La fosforilación más importante es la de Ser19, que además de promover el cambio conformacional de la NMII de la conformación plegada 10S a la forma extendida 6S, aumenta la actividad ATPasa del dominio motor. Esta fosforilación es clave para la activación de la NMII, ya que la molécula es enzimáticamente inactiva en su



ausencia (33, 34). La primera quinasa descrita que fosforilaba Ser19 fue MLCK (35). Posteriormente, se han descrito otras quinasas, que incluyen ROCK, MRCK, PAK y citrón quinasa (36-39). ROCK-I, MRCK y CitK también pueden fosforilar Thr18, que es un sitio de sinergia que aumenta la actividad ATPasa del dominio motor cuando Ser19 está fosforilada (40). Estas quinasas constituyen una red reguladora espacialmente segregada, mediante la cual la NMII es activada diferencialmente en la célula. Específicamente, MRCK y MLCK activan NMII cerca del frente celular (41-44), mientras que ROCK conduce la activación de la NMII en haces gruesos de actomiosina, definiendo el polo posterior de la célula (43, 44). Por su parte, CitK activa NMII durante el proceso de división celular, fosforilando RLC en el anillo de citoquinesis (45, 46).

La fosforilación en Ser19 (y Thr18) es inactivada por la fosfatasa MYPT1, cuya actividad depende a su vez de la fosforilación por ROCK (47). Otros residuos reguladores importantes de la RLC son Ser1 y Ser 2, que son sustratos de PKCs típicas (48, 49). Estas fosforilaciones inhiben la función de la NMII, haciendo a la RLC un sustrato de baja afinidad para la MLCK (50).

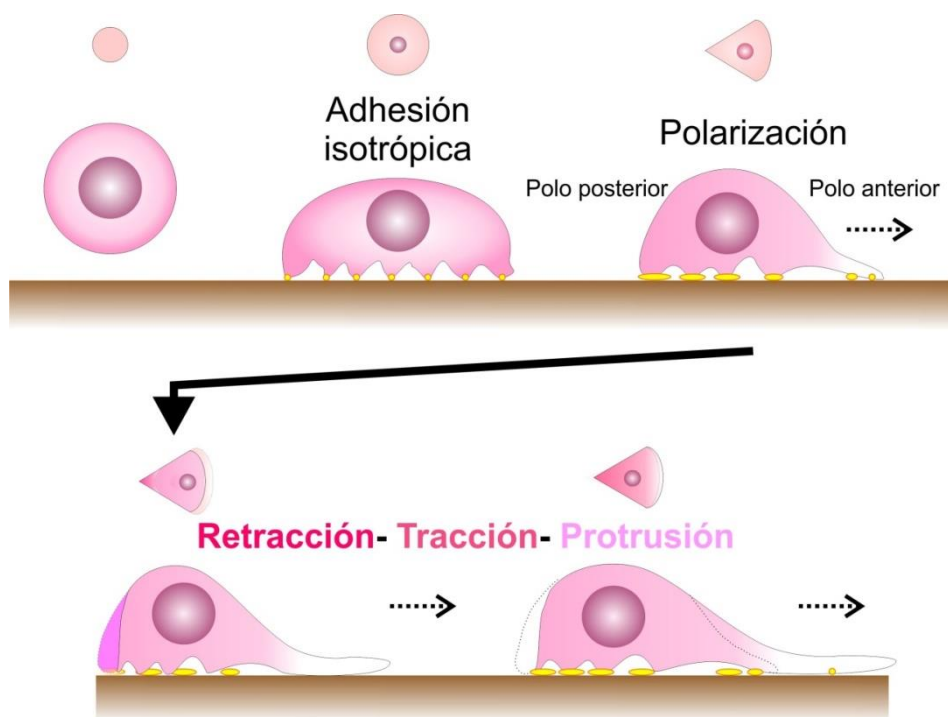
Estas modificaciones post-traduccionales regulan el estado conformacional de la NMII que, junto con la disponibilidad de ATP y de filamentos de actina, controlan los ciclos de contracción que generan fuerza mecánica. Estos se representan en el ciclo de Huxley/ Spudich. La miosina tiene una afinidad variable por los filamentos de actina dependiente de su unión a ATP (**Figura I4**). Cuando está unida a ATP la NMII se encuentra en una conformación separada de actina, debido a que se produce una hendidura que divide el sitio de unión a actina. La hidrólisis de ATP dependiente de actina y  $Mg^{2+}$  del dominio N-terminal de MHCII produce un cambio conformacional que cierra la hendidura y unifica el sitio de unión a la actina (puente cruzado para cerrar la hendidura), dotándola de alta afinidad por la actina. En este estado la ADP y Pi presentan poca afinidad por el sitio de unión al nucleótido favoreciendo su salida. La salida del fosfato resultante, induce un cambio conformacional que se transmite y amplifica en el dominio cuello, provocando el deslizamiento del filamento de actina con respecto al filamento de NMII (10 nm / paso de promedio). El intercambio de ADP por ATP abre de nuevo la hendidura, promoviendo así la disociación de actina de la NMII y reiniciando el ciclo.



**Figura I4. Modelo de activación de la NMII (“puente cruzado”).** La imagen representa el ciclo de interacción de NMII con ATP y filamentos de actina. NMII en purpura representa NMII unido a ATP (no ligado a actina); Azul claro representa el estado intermedio de ADP + Pi unido; y en azul oscuro representa el estado que contiene ADP, ligado a la actina. La imagen también incluye el intercambio de ADP a ATP y la liberación del fosfato hidrolizado. Imagen tomada de (51).

## 1.5. Funciones celulares de la NMII

La NMII participa en todos los procesos celulares que implican movimiento y/o generación de fuerza mecánica. El papel de la NMII en los procesos de división celular se ha revisado en numerosos artículos, por ejemplo (52). También se ha descrito el papel de la NMII en la generación y mantenimiento de estructuras multicelulares complejas, como epitelios (53). Finalmente, nuestro grupo y otros han descrito el papel de la NMII en procesos de interacciones funcionales entre células a través de estructuras bien definidas, como sinapsis neuronales (54) e inmunológicas ((55) y Ortega-Carrión et al., manuscrito en revisión). En este trabajo de Tesis Doctoral, nos hemos centrado en el papel de la NMII en la migración celular de células mesenquimales, como los fibroblastos. En concreto, este trabajo aborda aspectos específicos de la regulación de la migración individual de células mesenquimales que expresan los parálogos NMII-A y NMII-B en entornos bidimensionales (Figura I5).



**Figura I5.** Representación esquemática de la migración celular. El ciclo de migración celular en dos dimensiones se puede dividir en varias etapas: Extensión de la célula, generalmente isotrópica, seguida por el establecimiento de polaridad, con un polo anterior y un polo posterior. Posteriormente, se produce protrusión en el borde delantero (blanco), establecimiento de contactos adhesivos (en amarillo); tracción del cuerpo celular para desplazar el núcleo; y retracción del polo posterior (en fucsia).

La migración definida como hemos establecido en el párrafo anterior es un proceso complejo que se puede dividir en varios subprocesos: generación de asimetría (polarización); avance de la membrana del polo anterior (protrusión); generación de fuerza de tracción para propulsar el cuerpo celular, incluyendo los orgánulos de la célula; y la retracción del polo posterior para preservar la integridad estructural de la célula durante el proceso (**Figura I5-I6A**). Los diversos parálogos de la NMII contribuyen a la práctica totalidad de los subprocesos descritos anteriormente, desempeñando funciones redundantes y específicas. La especificidad de dichas funciones se basa en su capacidad diferencial para formar mini-filamentos *de novo* y en la naturaleza de las estructuras que forman. NMII-A es capaz de formar abundantes mini-filamentos pequeños y discontinuos *de novo* en el frente de avance. Por el contrario, NMII-B no es capaz de formar estos filamentos *de novo*, requiriendo estructuras preformadas (los propios mini-filamentos de NMII-A) para acoplarse a continuación de los mismos (56). Esta propiedad determina una distribución diferencial de los parálogos. NMII-A aparece distribuida de una manera relativamente uniforme, formando filamentos cortos y discontinuos a lo largo de todo el cuerpo celular

(Figura I6B). Por el contrario, NMII-B se encuentra restringida a las regiones más centrales y el extremo posterior, donde forma filamentos mucho más largos y robustos (Figura I6B) (57). El efecto que estas propiedades de los parálogos tienen en los subprocesos de la migración celular se describe en los siguientes párrafos.

### 1.5.1. NMII inicia y mantiene la polarización anteroposterior

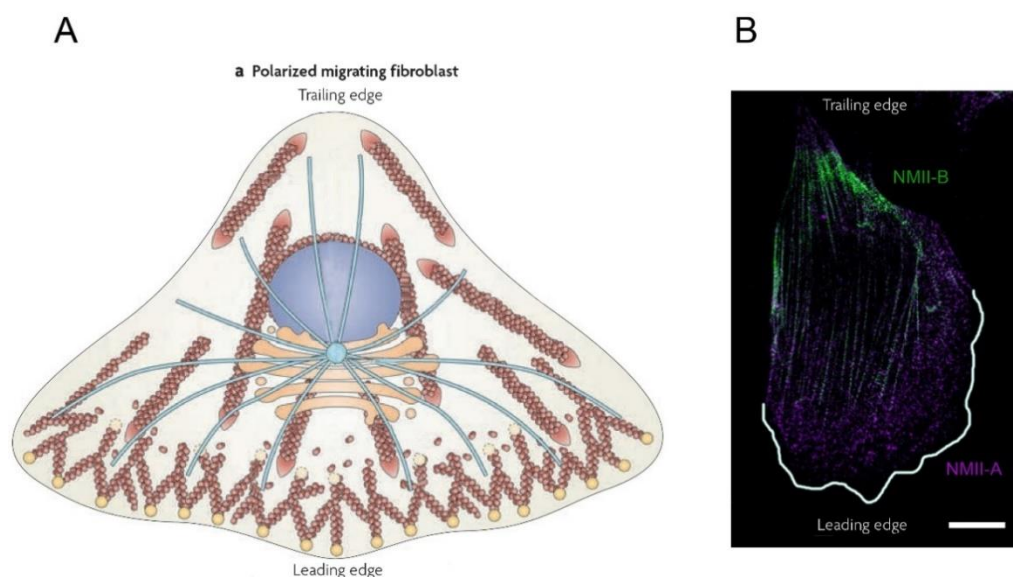
La NMII es un factor clave en la iniciación de la polarización migratoria (58-60). La acumulación de mini-filamentos de NMII en una región de la célula define esa región como el polo posterior. La localización de dicha acumulación depende de la existencia de señales extracelulares, que pueden ser quimiotácticas (48) o durotácticas (61). Tales señales generalmente definen el polo anterior, donde la NMII está mayoritariamente ausente (62), o presente pero en forma no ensamblada (41). En ausencia de señales extracelulares, la NMII forma filamentos que se posicionan de manera aleatoria (56, 59).

NMII-A inicia el proceso de nucleación de mini-filamentos que define el polo posterior. Sin embargo, en ausencia de NMII-B, estos mini-filamentos pueden desensamblarse, y la célula no es capaz de desarrollar una polarización antero-posterior estable (56). Por tanto, aunque NMII-A inicia el proceso de polarización, este requiere NMII-B para consolidarse. El papel de NMII-B en este proceso parece depender de su capacidad para generar tensión localizada (no contractilidad), ya que un mutante no contráctil de NMII-B (R709C) restaura la polaridad anteroposterior (63).

Algo similar ocurre en células en las que se ha eliminado genéticamente NMII-A con siRNA. Aunque la mayor parte de estas células no se polarizan, existe un pequeño porcentaje de células que se polarizan exageradamente. Esto se debe a que, como se ha descrito anteriormente, el ensamblaje de mini-filamentos de NMII-A cataliza el ensamblaje de mini-filamentos de NMII-B (56). Cuando los niveles de NMII-A se reducen con siRNA, la NMII-A restante es capaz de catalizar el ensamblaje de filamentos de NMII-B, pero no es suficiente para mantener todas las funciones celulares de la NMII-A, resultando en células que tienen largos haces de NMII-B pero no son capaces de mantener la coherencia celular, deformándose a lo largo del eje anteroposterior (63, 64).

Existen células que migran rápidamente (por ejemplo leucocitos), que se definen por su capacidad para responder rápidamente a señales quimioatrayentes. En este caso, es el

polo anterior el que define la asimetría, y estas células pueden migrar polarizadamente en ausencia de NMII-B, aunque sí requieren NMII-A (65).



**Figura I6. (A) Representación esquemática de un fibroblasto migratorio. La dirección de migración es hacia abajo.** Se representa la compartimentación del frente de avance, que contiene actina dendrítica, la lamela a continuación, donde ocurre la maduración inicial de las adhesiones, y el cuerpo celular conteniendo el núcleo. Adaptado de (32). **(B)** Imagen de microscopía confocal que muestra la distribución diferencial de NMII-A y NMII-B endógena en una célula CHO.K1 polarizada, como se describe en la introducción de la sección 1.4.

## 1.5.2. NMII controla la geometría de la actina citoplasmática y la evolución espaciotemporal de los contactos adhesivos

Como se ha descrito en la sección anterior, la NMII define la organización en haces de filamentos de la actina en el polo posterior de la célula polarizada. En el polo anterior, la actina adopta diversas geometrías, incluyendo una configuración dendrítica en el lamelipodio, que define el extremo de la zona de extensión de la membrana (protrusión) (**Figura I7**). Esta zona se caracteriza por no presentar NMII en filamentos, excluida activamente por un mecanismo de inactivación de la quinasa MLCK (41). En cambio, la actina está organizada por nucleadores de actina, como Arp2/3 que genera los puntos de ramificación; y forminas en el extremo positivo de los filamentos, más cercano a la membrana (66). Esta geometría dendrítica de la actina permite el ensamblaje de adhesiones menores de 200nm de diámetro y con una vida media muy corta (60-120s), denominadas adhesiones nacientes (67, 68). El lamelipodio normalmente se presenta como una banda estrecha (aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ) en el extremo más exterior del frente de avance, que presenta un rápido flujo retrógrado independiente de NMII (62). La hipótesis del “embrague

molecular” (descrito en más detalle en la sección 1.5.5) postula que la unión de la actina al sustrato por medio de las adhesiones nacientes desviaría las fuerzas creadas por el flujo retrogrado de la actina al sustrato, permitiendo la protrusión (69-71). Tras el lamelipodio, la actina comienza a reorganizarse en haces de filamentos de mayor longitud y grosor. Esta región se denomina la lamela, y presenta un flujo de actina dependiente de NMII y mucho más lento que el del lamelipodio (62). Los haces de filamentos de actina definen la elongación de las adhesiones nacientes. Sólo aquellas adhesiones nacientes asociadas a los haces de filamentos de actina se vuelven alargadas. Por el contrario, aquellas adhesiones que no están asociados a estos haces se desensamblan y sus componentes son reciclados para generar nuevas adhesiones nacientes bajo el lamelipodio que se ha desplazado hacia delante. Nuestro grupo ha demostrado que esta elongación requiere  $\alpha$ -actinina y NMII-A (68). El motivo es que la NMII-A presente en la región frena la velocidad de flujo retrógrado de la actina (72), generando zonas favorables para el ensamblaje de estructuras adhesivas (73). Además, la función de NMII en la lamela controla la tasa neta de avance de la membrana, ya que las contracciones periódicas promovidas por NMII contrarrestan el avance mediado por polimerización de actina en el lamelipodio (41). En este sentido, la NMII presente en la lamela limita la velocidad de protrusión, que aumenta hasta tres veces cuando se inhibe la NMII químicamente o con siRNA (63, 68).

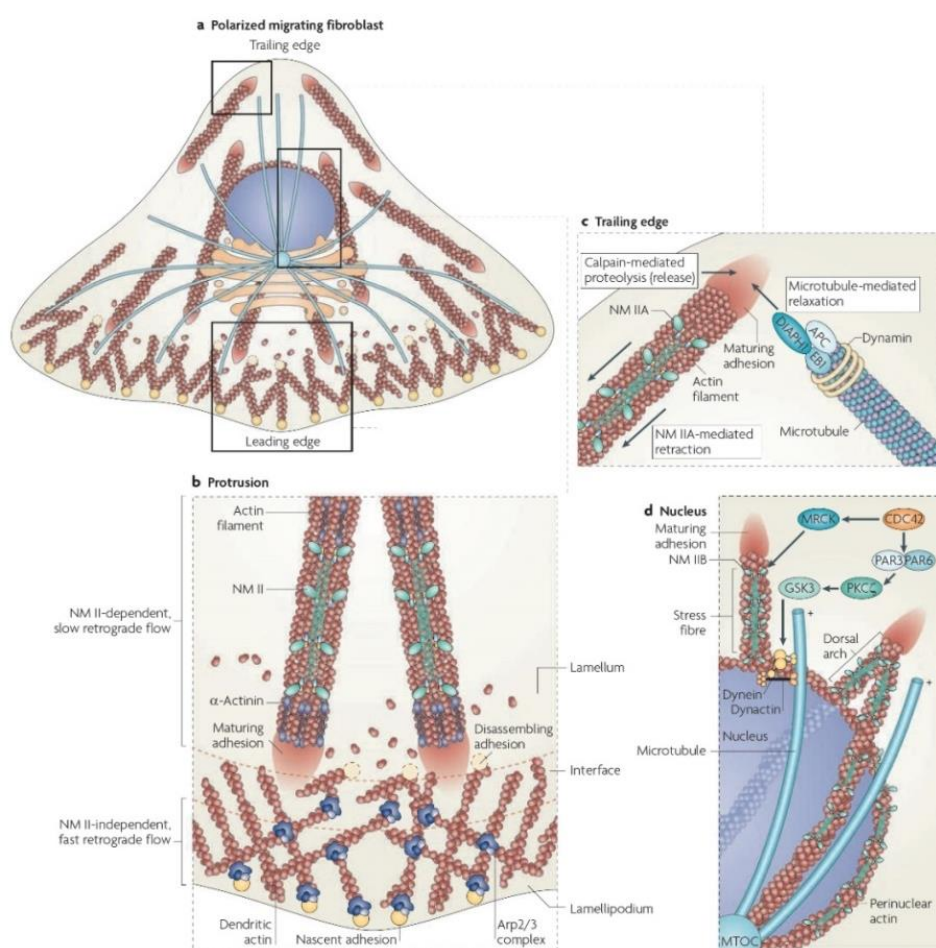
### **1.5.3. Función de la NMII en el desplazamiento del cuerpo celular y la evolución terminal de los contactos adhesivos**

La NMII también participa en el posicionamiento de orgánulos celulares en el cuerpo celular, particularmente el núcleo. La NMII controla la distancia entre el centrosoma y el núcleo, controlando su reposicionamiento durante la migración (74). En este proceso es particularmente importante el parólogo NMII-B, ya que su eliminación produce la pérdida del anclaje nuclear, que causa un movimiento de rotación nuclear continuo (63). A nivel de los contactos adhesivos en esta zona, la NMII participa en la maduración terminal de las adhesiones que han comenzado a madurar en la lamela. Las adhesiones en la lamela comienzan a alargarse a lo largo de “moldes” constituidos por los haces de filamentos formados en respuesta a la actividad de NMII-A (68). Sin embargo, estas adhesiones lamelares aún pueden desensamblarse (56, 75). Si los haces se vuelven más gruesos por la incorporación de NMII-B a los mismos, las adhesiones se estabilizan terminalmente, con una vida media mayor de 30 min, pudiendo perdurar durante horas o días (56).



#### 1.5.4. NMII está implicada en la retracción del polo posterior durante la migración.

En el polo posterior, NMII (**Figura I7**). La tracción dependiente de NMII-A desempeña un papel fundamental en el desensamblaje de las adhesiones para permitir la retracción de la cola y mantener la morfología de la célula. Además de la tracción mediada por NMII-A, otros mecanismos cooperan en el desensamblaje de las adhesiones en esta región, incluyendo la proteólisis mediada por calpaina (76), la internalización de integrinas mediada por clatrina (77) y el aporte de factores de desensamblaje asociados a los extremos de los microtubulos (78).



**Figura I7. Diferentes estados de empaquetamiento de la actina y localización de los orgánulos.** En el frente de avance de la célula, la NM II regula el flujo retrógrado limitando así la protrusión. En el lamelipodio se forman adhesiones nacientes y ramificación de actina dendrítica mediada por el complejo Arp2/3. En la interfase lamelipodio-lamela, la actina se despolimeriza y las adherencias se desensamblan o empiezan a madurar mediado por NMII. Además, la NMII controla la orientación del centro organizador de microtubulos (MTOC) y el Golgi. NMII se piensa que actúan en concierto PAR3 (el CDC42-partición defectuosa 3) o PKC $\zeta$  (PAR6-proteína quinasa C $\zeta$ ) vía (GSK3) (glicógeno sintasa quinasa 3) para polarizar la célula. La quinasa de unión a CDC42 relacionada con la distrofia miotónica (MRCK, también conocida como CDC42BP) activa NMII y regula su efecto sobre el reposicionamiento del núcleo.

### **1.5.5. La NMII es un elemento esencial en los procesos de transducción mecánica de señales en los contactos adhesivos.**

Como se ha descrito en las secciones anteriores, la progresión de la migración celular está asociada a la evolución de los contactos adhesivos con la matriz extracelular. La NMII desempeña varios papeles fundamentales en la integración espaciotemporal de las adhesiones en el contexto de la migración celular. En primer lugar, la NMII crea las condiciones para el crecimiento de las adhesiones en la zona de transición entre el lamelipodio y la lamela. Este proceso involucra el reclutamiento de proteínas adaptadoras a esta región; su interacción con los receptores de adhesión (principalmente integrinas) y su anclaje a los haces de filamentos. Este proceso tiene un claro componente bioquímico. Por ejemplo, las integrinas inmovilizadas se fosforilan en sus dominios citoplasmáticos, y esto inhibe el reclutamiento de adaptadores como talina (79). Sin embargo, este es un proceso con un componente mecánico. La talina es una proteína con dos dominios bien diferenciados: el extremo N-terminal interacciona con el dominio citoplasmático de la integrina, mientras que el C-terminal interacciona con actina y vinculina. Experimentos *in vitro* han demostrado que la activación mecánica de la talina promueve su despliegue conformacional (80), permitiendo el reclutamiento de la proteína vinculina a la adhesión, amplificando los sitios potenciales de interacción con los microfilamentos. Otras moléculas de las adhesiones son también sensibles a las fuerzas mecánicas, cambiando su conformación (integrinas, talina) (80, 81), sus propiedades de unión a otras proteínas (zyxina) (82) o la accesibilidad de residuos específicos a la acción de quinasas (p130CAS/BRCA1)(83) en respuesta a la aplicación de fuerzas mecánicas a través de su estructura. Estas propiedades hacen de los contactos adhesivos auténticos nodos mecánicamente activos a través de los cuales las células aplican fuerzas sobre la matriz extracelular, reorganizándola; pero también reciben señales mecánicas, cambiando su composición y dinámica en respuesta a las mismas. Estos efectos constituyen un claro exponente de la transducción mecánica de señales (“mecanotransducción”), en la cual las señales mecánicas alteran las propiedades bioquímicas de los complejos macromoleculares (por ejemplo, las fuerzas sobre la talina crean nuevos sitios de unión para vinculina), y viceversa, las señales bioquímicas alteran las propiedades mecánicas y/o la generación de fuerzas (por ejemplo, la activación bioquímica de quinasas que fosforilan la RLC de NMII, aumentando la contracción de la NMII y la aplicación de fuerza a través de los contactos adhesivos).



Los distintos niveles de regulación mecánica de los componentes de los contactos adhesivos permiten explicar con gran detalle la hipótesis del “embrague molecular”, mencionada inicialmente en la sección 1.5.2. De acuerdo con esta hipótesis, la dinámica de los contactos adhesivos está regulada mecánicamente por una cadena de eslabones mecanosensibles que incluye las proteínas componentes de la matriz extracelular, los receptores de adhesión (integrinas), algunos adaptadores de los receptores que se acoplan al citoesqueleto (por ejemplo, talina), llegando a los motores moleculares (como NMII) que controlan la magnitud de las fuerzas mecánicas. El aspecto clave de esta hipótesis es que la maquinaria adhesiva mecanosensible requiere un acoplamiento graduado de sus componentes para generar la tracción necesaria para mover el cuerpo celular, teniendo en cuenta que un exceso de acoplamiento resultará en una aplicación exagerada de fuerza que no permitirá el movimiento celular (84, 85).

#### **1.5.6. Entrecruzamiento y contracción en la regulación de la arquitectura de los microfilamentos y el control de la dinámica de las adhesiones focales**

Además de la NMII, existen muchas otras moléculas cuya función es controlar la arquitectura de los microfilamentos, desde proteínas de nucleación de los filamentos como Arp2/3 y forminas (66) a proteínas que controlan la polimerización de actina, como profilina; y su despolimerización, como ADF/cofilina (86). Algunas proteínas de unión a actina permiten la unión del citoesqueleto con la membrana plasmática, como talina (87) o las proteínas de la familia ezrina/radixina/moesina (ERM) (88). Otras familias, por el contrario, controlan la organización geométrica de los filamentos. En esta clasificación, la NMII pertenece a este último grupo, que también incluye entrecruzadores no contráctiles como tropomiosinas;  $\alpha$ -actininas; filaminas, cortactinas, y otras.

**Tropomiosina (TPM):** Es un entrecruzador de actina ligado desde su descubrimiento a la NMII ya que, en células musculares, la TPM compite con la miosina II muscular por el sitio de unión a actina (revisado en (89)). En células no musculares, las TPM musculares y no musculares tienen un efecto diferente dependiente de isoforma de TPM y parálogo de NMII (90). En estas células, la TPM se une lateralmente a los filamentos de actina, entrecruzándolos de manera anti-paralela. Existen unas 40 isoformas de TPM con funciones solapantes y específicas (91, 92). Esta variedad surge de variantes de *splicing* de cuatro genes de TPM diferentes. Por ejemplo, la isoforma TPM1 define la forma esquelética de TPM (secuencia de exones 1a-2b-6b-9a), que controla la velocidad de los filamentos de miosina muscular. Específicamente, el exón 9a aumenta la velocidad de los filamentos, y su intercambio por el exón 9d en células

no musculares confiere a esta isoforma la capacidad de estabilizar las fibras de tensión (93). Un estudio reciente ha descrito el papel de la TPM como sensor de rigidez extracelular y controlador de la contracción mediada por NMII durante la adhesión celular (94).

**$\alpha$ -actinina (AACT):** Las  $\alpha$ -actininas son un grupo de cuatro proteínas (AACT1-4) que entrecruzan actina formando haces paralelos y anti-paralelos. Las isoformas 1 y 4 se expresan ubicuamente, mientras que las isoformas 2 y 3 están restringidas a neuronas y músculo, respectivamente (95). A través de su interacción con la cola de las integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha$ -actinina puede también mediar la asociación de los microfilamentos a la membrana plasmática (96). Desde su descubrimiento como un elemento de las adhesiones focales (97), varios estudios previos han demostrado que la  $\alpha$ -actinina es esencial para la progresión del ensamblaje de los filamentos de actina que permiten la evolución de las adhesiones focales (68), actuando como un transmisor de fuerzas mecánicas generadas en el filamento (por NMII mayoritariamente) hacia las adhesiones focales (98).

**Filamina (FLN):** Las filaminas son un grupo de entrecruzadores de actina que se unen formando redes ortogonales de actina (99). Como  $\alpha$ -actinina, las FLN también se unen al tallo citoplásmico de las integrinas  $\beta 1$ , inhibiendo su activación (100). Recientemente, se ha descrito su papel como sensor de la rigidez del medio extracelular (101) y elemento mecano-acumulativo de tensión (102).

**Cortactina (CTN):** La cortactina es una proteína de unión a actina que genera redes preferencialmente dendríticas, ya que su unión al complejo Arp2/3 aumenta la nucleación que promueve este tipo de arquitectura (103). La cortactina, por tanto, aparece preferencialmente en el lamelipodio (104).

Globalmente, la asociación de los microfilamentos a unas u otras de estas proteínas entrecruzadoras (incluyendo la NMII) determina el tipo de geometría de los microfilamentos, y por tanto parámetros funcionales como la distribución de proteínas asociadas, flujos de tensión, contracción y retracción y adaptación al microentorno que definen la arquitectura celular.

#### 1.5.7. Control espaciotemporal de la función de la NMII

Uno de los mecanismos principales de integración de los fenómenos mecánicos y bioquímicos descritos hasta este punto son los mecanismos de señalización. La migración direccional induce mecanismos de amplificación polarizada de la señal que son los

responsables últimos de los fenómenos de polarización, adhesión, tracción y retracción descritos hasta el momento. En esta sección, nos centraremos en el control de la actividad de NMII. Este proceso está coordinado por GTPasas de pequeño tamaño molecular de la subfamilia Rho (105). Brevemente, estas moléculas actúan como interruptores moleculares (activos cuando están unidos a GTP) que se inducen en respuesta a la activación de receptores de tipo integrina, receptor de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G o receptor tirosina quinasa, por ejemplo EGFR. Cuando están unidas a GTP, estas proteínas se unen a efectores que pueden activar, o inhibir, diversas vías de señalización. Algunos ejemplos son la activación de MRCK por Cdc42 en el frente de avance (42); o la activación de ROCK por RhoA en el polo posterior, que determinan la activación, o inactivación localizada de la NMII.

La descripción espaciotemporal de la activación de las Rho GTPasas en células migratorias y su relación con la NMII permite dibujar esquemas superpuestos de activación polarizada de los parálogos de NMII que definen su función en el proceso migratorio. Experimentos utilizando sondas de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) han demostrado que las primeras GTPasas activadas son RhoA y Cdc42, ambas muy cerca del frente de avance (106). El papel fundamental de esta activación temprana de RhoA es activar a las forminas para inducir polimerización de actina en el lamelipodio (107). Cdc42 desempeña una función similar activando otras forminas (108), pero también el complejo Arp2/3 (109), que permite la ramificación de la actina en esta región (110). Se podría postular que Cdc42 también podría inhibir la activación de NMII en esta región a través de la activación de la proteína quinasa PAK, que inactiva el ensamblaje de filamentos a través de la fosforilación de MHCII (30). La activación de PKC en el frente de avance también podría contribuir a este proceso (48).

La activación temprana de RhoA y Cdc42 está seguida por la activación de Rac (106), que amplifica la activación de Arp2/3 a través de un complejo multimolecular que incluye WAVE/Scar, Abi1 y otras proteínas para consolidar la estructura del lamelipodio (111). Finalmente, se observa un aumento de la actividad RhoA en la lamela (106), que pone en marcha los mecanismos de nucleación de mini-filamentos de NMII que hemos descrito con anterioridad.

En este trabajo de Tesis Doctoral, nos hemos centrado en la existencia de mecanismos adicionales a los descritos en esta Introducción que regulan la actividad NMII en células migratorias. El trabajo se ha enfocado en dos mecanismos separados, pero

complementarios: por una parte, la posible existencia de residuos reguladores adicionales en la RLC que puedan regular la actividad, o el ensamblaje, de la NMII por fosforilación u otra modificación post-traducciona. Por otra parte, hemos investigado el papel de la actividad entrecruzadora de la actina en la transmisión de las fuerzas mecánicas generadas por la propia NMII en los filamentos y su transformación en tracción para permitir el movimiento celular.

# Objetivos

## 2. Objetivos

El objetivo de estudio de este trabajo de Tesis doctoral es determinar la existencia de mecanismos y funciones adicionales a la regulación ya descrita de la NMII en células migratorias que determinan la función celular de los dos parálogos principales. Los objetivos se dividen en dos partes fundamentales.

**Parte 1. Estudio de la existencia de nuevos puntos de regulación basados en la fosforilación de la cadena ligera diferentes de los ya identificados de fosforilación en Thr18/Ser19 y Ser1/Ser2.**

- Identificación de nuevos residuos fosforilados en la RLC.
- Estudio de las vías de señalización que controlan las fosforilaciones identificadas en el objetivo anterior.
- Estudio de la regulación de la RLC a través de las fosforilaciones identificadas en los objetivos funcionales y determinación de su efecto a nivel celular.

**Parte 2. Determinación de la contribución diferencial de las actividades motora y entrecruzadora de actina de la NMII a los procesos de transmisión de la tracción al sustrato y dinámica de las adhesiones focales.**

- Estudiar el efecto sobre la tracción y dinámica de las adhesiones de mutantes no contráctiles de NMII.
- Determinar el papel de la contracción y el entrecruzamiento de actina en la estabilidad de las adhesiones focales, así como el papel de la geometría de dicho entrecruzamiento en la tracción y la dinámica de las adhesiones focales.

# **Materiales y métodos**

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Plásmidos

Los plásmidos de expresión usados en la presente Tesis Doctoral se enumeran en la siguiente Tabla (Tabla M.1). Las mutaciones utilizadas en este trabajo también se indican en la Tabla.

**Tabla M1. Lista de plásmidos utilizados.**

Proteína (gen y número de acceso)	Especie	Marcaje	Generado por
$\alpha$ -actinina-1 (AACT1, NM_001102.3)	<i>Homo sapiens</i>	EGFP/ mCherry	C. Otey y M. Edlund (UNC) (112) Miguel Vicente
$\beta$ -actina (ACTB, NM_001101.3)	<i>Homo sapiens</i>	EGFP/ mCherry mEOS	T. Mitchinson (Harvard) (113) Miguel Vicente Addgene
Cortactina (CTTN, NM_138565.2)	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	T. Parsons (UVa) (104)
Filamina-A (FLNA, NM_001456.3)	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	A. Sonnenberg (NKI) (114)
GFP (Genbank U55763.1, pEGFP-C1; U57607.1, pEGFP-C3; 55762.1, pEGFP-N1; U57609.1, pEGFP-N3)	<i>Aequorea victoria</i>	EGFP	Clontech (Takara Biosciences)
Lifect (ABP140 1-17, NM_001183658.6)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EGFP/ mCherry	R. Wedlich-Soldner (115) Miguel Vicente
GST (Genbank U78872)	<i>Schistosoma japonicum</i>	GST	GE Life sciences
mCherry (Genbank AY678264.1, subclonado por PCR, sustituyendo a la GFP en los vectores anteriores)	-	mCherry	R. Tsien (UCSD) (116)
MHCII-A (MYH9, NM_002473.5)	<i>Homo sapiens</i>	FLAG/ GFP / mCherry	R. Adelstein (NIH) (117), construcción original de



Forma salvaje ( <i>wild type</i> ) N93K HMMII-A			forma salvaje fusionada a EGFP. Miguel Vicente y <b>Rocío Aguilar</b> , resto de construcciones y marcajes
MHCII-B ( <i>MYH10</i> , NM_005964.3)  Forma salvaje ( <i>wild type</i> ) R709C HMMII-B	<i>Homo sapiens</i>	FLAG / GFP / mCherry	R. Adelstein (NIH) (117), construcción original de forma salvaje fusionada a EGFP. Miguel Vicente y <b>Rocío Aguilar</b> , resto de construcciones y marcajes
RLC/MLC2 ( <i>MYL9</i> , NM_205278.1)  Forma salvaje ( <i>wild type</i> ) T18D/S19D T18A/S19A  Y142F Y155F Y142F/Y155F 18D19D142F 18D19D155F 18D19D142F155F 18A19A142F 18A19A155F 18A19A142F155F	<i>Gallus gallus</i>	FLAG / GFP / mCherry/ GST	K. Kelly (NCI), construcción original de forma salvaje fusionada a GFPK. Kelly (NCI)  Miguel Vicente y <b>Rocío Aguilar</b> , resto de construcciones y marcajes
Tropomiosina- $\alpha$ (TPM1, XM_015278774.1)	<i>Gallus gallus</i>	GFP/mCherry	D. Dube (SUNY) (118)
Vinculina (VCL, XM_015288200.1)	<i>Gallus gallus</i>	GFP  mCherry	S. Craig (Johns Hopkins U.) (119) Miguel Vicente

Los mutantes puntuales de RLC se obtuvieron por mutagénesis dirigida utilizando el sistema GeneTailor (Invitrogen). Los cebadores utilizados fueron:

Secuencia	Mutante
5' acgaggaggtggacgagatg <b>TTC</b> cgggagggcgcc 3' 3' tccaagtgactgctcctccacctgctctac 5'	RLC Y142F
5' acaagaagggcaacttcaac <b>TTT</b> gtggagttcac 3' 3' cgcgggtagctgttcttcccgttgaagttg 5'	RLC Y155F

Todas las mutaciones fueron verificadas por secuenciación de ADN (Secugen S.L., Madrid, España).

Las meromiosinas (mutantes truncados de cadena pesada) marcadas con GFP o FLAG HMMII-A (aa 1-1339) y II-B (aa 1-1337) se obtuvieron por PCR sobre la forma completa usando los sitios de corte de las enzimas de restricción AgeI/EcoRI (II-A) y AgeI/XmaI (II-B).

También se han utilizado RNA de interferencia (shRNA) clonados en el vector pSUPER. Las secuencias contra MHCII-A (gen *Myh9*) y MHCII-B (gen *Myh10*) han sido descritas previamente (63). La secuencia contra RLC (*Myl12A/ Myl12B*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *C. griseus*) utilizada: GGGATGGCTTCATTGACAA fue obtenida en colaboración con el Dr. Brenton Hoffmann (Duke U, NC, USA). Esta secuencia está ausente en RLC (*Myl9*) de *G. gallus*, usada para el rescate funcional del silenciamiento de RLC endógena dado su elevado grado de homología (99% identidad de secuencia a nivel de proteína). Como siRNA control se usó la secuencia CGTACGCGGAATACTTCGA. Ambos siRNA fueron insertados en el vector pSUPER (Oligoengine) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## 3.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en este trabajo se muestran en la siguiente Tabla (Tabla M.2):

**Tabla M2 Lista de anticuerpos primarios utilizados.**

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Referencia y casa comercial
4G10	pTyr	Ratón	Millipore
8471	pY155 RLC	Conejo	Pierce (custom)
DM1A	$\alpha$ -tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich
EGFR	EGFR	Conejo	Abcam
GFP	GFP	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
hVIN-1	Vinculina	Ratón	Sigma-Aldrich
IGFR	IGFR	Conejo	Cell signaling
M2	FLAG	Ratón	Sigma-Aldrich
MHCII-A	MHCII-A	Conejo	Biolegend
MHCII-B	MHCII-B	Conejo	Biolegend
PKC $\zeta$	PKC $\zeta$	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
pS19 RLC	pS19 RLC	Conejo	Rockland
pT18+pS19 RLC	pT18+pS19 RLC	Conejo	Cell Signaling
PY72	pTyr	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
PY99	pTyr	Ratón	Santa Cruz Biotechnology
RLC	RLC	Conejo	Rockland
VIM-13.2	Vimentina	Ratón	Sigma-Aldrich

El anticuerpo anti-pY155 fue desarrollado en conejo por Thermo Pierce usando los siguientes péptidos conjugados de inmunización KLH: KGNFN (pY) VEFTRIC. Se administraron cuatro rutinas de inmunización durante 72 días y las muestras de suero

fueron recogidas y probadas en los días 24, 48 y 72. Una última estimulación fue administrada en el día 73, y el suero total fue recolectado el día 84. El antisuero fue purificado por afinidad y testado por ELISA por Thermo Pierce y por Western blot por nuestro laboratorio (como se indica en la **Figura R2**). Se detectó que el anticuerpo ofrecía resultados positivos en ensayos de ELISA y Western blot, y negativo para ensayos de inmunoprecipitación, inmunofluorescencia y citometría de flujo.

### 3.3. Reactivos

Los reactivos que se usaron fueron los siguientes (Tabla M.3):

**Tabla M3. Lista de reactivos utilizados**

Reactivo	Referencia	Casa comercial
2% bis-acrilamida	161-0142	BioRad
3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate	M6514-25ML	Sigma Aldrich
40% acrilamida	161-0140	BioRad
Blebistatina		
Calyculin A	BML-E1192-0025	Enzo Lifesciences
Cocktail inhibidor de proteasas	11231400	Sigma-Aldrich
Cocktail inhibidor de fosfatasas 2	P5726-5 ML	Sigma-Aldrich
Cocktail inhibidor de fosfatasas 3	P0044-5ML	Sigma-Aldrich
Cubreobjetos 13mm	631-0150	VWR
Cubreobjetos 18mm	631-0669	VWR
Cubreobjetos 25mm	W2605	Thermo Scientific
Dynasore hydrate	D7693	Sigma-Aldrich
EGFR activo humano	SRP0239	Sigma-Aldrich
Enzimas de restricción	Varias	New England Biolabs
Fibronectina	F2006	Sigma-Aldrich

FluoSphere® Carboxylate-Modified Microspheres-Alexa647	F8806	Thermo Fisher Scientific
IPTG	I6758-5G	NZY Tech
Jet-PEI DNA transfection reagent	101-40N	Polyplus
Kits de purificación de ADN	740416.5	Invitrogen (miniprep) Macherey (maxiprep)
Persulfato amónico	A3678	Sigma-Aldrich
Proteasa Prescission™	27-0843-01	GE Healthcare
Repel-silane ES	GE17-1332-01	GE Healthcare
rhEGF	PHG0311	Invitrogen
rhIGF-1	PHG0071	Invitrogen
Sulfo-SANPAH	22589	Pierce
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich
Triton X-100	T8787-50ML	Sigma-Aldrich
XtremeGENE HP transfection reagent	06366546001	Sigma-Aldrich

La procedencia y uso del resto de reactivos utilizados en este trabajo se indica en cada caso a lo largo de los Materiales y Métodos.

### 3.4. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo son: HEK-293 (carcinoma renal humano, ATCC #CRL-1573), A549 (carcinoma pulmonar humano, ATCC #CCL-185), CHO.K1 (epitelio de ovario de hámster, ATCC #CCL-61) y COS-7 (epitelio de riñón de mono transformado por SV40, ATCC #CRL-1651). Las líneas celulares HEK-293, A549 y COS-7 se cultivaron en medio DMEM (4,5g/L glucosa). La línea celular CHO.K1 fue cultivada en medio DMEM (1g/L glucosa). Ambos medios fueron suplementados con 10% FBS, 4mM L-glutamina, 1% aminoácidos esenciales y 100U/mL penicilina y 100U/mL estreptomicina.

### 3.5. Transfección

Las células se transfectaron con reactivos basados en liposomas (jetPEI y XtremeGENE-HP), para ello se usó 2.5µl del reactivo por cada µg de DNA correspondiente a cada proteína a transfectar. Los experimentos de sobreexpresión fueron realizados 24h post-transfección. Los experimentos de interferencia se realizaron a 72-96h. En estas últimas, los experimentos de rescate se realizaron en un exceso 10:1 de vector de interferencia: vector de rescate. Esta proporción de DNA en la transfección asegura el descenso en los niveles de proteína endógena en células positivas para fluorescencia, lo cual se comprobó rutinariamente por inmunofluorescencia o citometría de flujo.

### 3.6. Inmunofluorescencia

Las células fueron disociadas de la placa de cultivo con tripsina, resuspendidas y adheridas sobre cubreobjetos recubiertos con 2 µg/ml fibronectina durante 90 minutos a 37°C. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído (grado EM, 4% en PBS) durante 10 min y permeabilizadas con Tritón X-100 (0.5% en TBS) durante 5 min, todo ello a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Para la tinción los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos primarios indicados diluidos en tampón PHEM buffer (60mM PIPES, 25mM HEPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub> pH6.9, conteniendo 1% BSA y 50 µg/ml inmunoglobulina humana de suero) durante 2h a 37°C, lavados dos veces con TBS 1x a temperatura ambiente; e incubados durante 30 min a 37°C con los anticuerpos secundarios correspondientes (y/o faloidina) conjugados con Alexa488/568/647. Los cubreobjetos se lavaron tres veces con TBS 1x y una vez con agua destilada a temperatura ambiente y se montaron usando medio de montaje Mowiol para ser examinados mediante microscopía confocal (ver más adelante).

### 3.7. Producción de RLC recombinante y ensayo *in vitro* quinasa

Los distintos mutantes así como la forma salvaje de RLC recombinante se clonaron en el plásmido pGEX-6P1 en fase con GST. Estos plásmidos se transformaron en bacterias deficientes en proteasas (cepa BL21 (DE3) pLysS, de Invitrogen). Se

prepararon inóculos de 30 ml de LB/Ampicilina y se dejaron creciendo durante toda la noche a 37°C con agitación (220 rpm en agitador orbital). Los inóculos se diluyeron 10 veces (300 ml de LB/Ampicilina) y se dejaron crecer durante 1-2h más hasta llegar a una densidad óptica ( $OD_{600nm}$ ) de 0.8-1.2 (fase de crecimiento exponencial). Tras ese tiempo, las bacterias fueron inducidas con 0.3mM IPTG durante 3h a 30°C en agitación constante. Posteriormente las células fueron recolectadas por centrifugación, incubadas con TBS 1x frío conteniendo 1 mg/ml de lisozima e inhibidores de proteasas durante 1h a 4°C y disociadas mediante ultrasonidos (40% potencia, 5 ciclos, 30s/ciclo). Los lisados se clarificaron por centrifugación (11,000  $\times g$ , 30 min a 4°C) y el sobrenadante se incubó con 300 $\mu$ L de microesferas de agarosa-glutation (ABT) durante 2h a 4°C en rotación constante (15 rpm). Después de este tiempo las microesferas se lavaron cinco veces con TBS 1x frío (sin inhibidores de proteasas) e incubadas con 20U de proteasa PreScission<sup>TM</sup> (GE Lifesciences) en 200 $\mu$ L de buffer Prescission (50 mM Tris HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) a 4°C conforme a las instrucciones del fabricante. 1/10 de la preparación se resolvió por PAGE/SDS y tinción con Bluesafe (NZY) para determinar la pureza y calcular la concentración de proteína obtenida por interpolación en una curva patrón de BSA.

Para los ensayos *in vitro* quinasa, usamos 0.5  $\mu$ g de EGFR activo humano (quinasa) diluido en 5 $\mu$ L de buffer quinasa, que contenía 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM  $\beta$ -glicerol-fosfato, 20mM  $MgCl_2$ , 12.5mM  $MnCl_2$ , 5mM EGTA, 2mM EDTA. A esta mezcla se añadieron 2.5 $\mu$ L (1.25 $\mu$ g) de RLC recombinante obtenida de la purificación; 2.5 $\mu$ L de  $H_2O$  y 2.5 $\mu$ L buffer quinasa conteniendo 250 $\mu$ M ATP y 0.25mM DTT. La reacción de fosforilación se llevó a cabo durante 15 minutos a 30°C y se detuvo añadiendo 20 $\mu$ L de buffer Laemmli 4x. Las muestras se calentaron a 90°C durante 5 min y se resolvieron por PAGE/SDS. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con anticuerpos específicos contra EGFR (control de carga de la quinasa), RLC (control de carga del sustrato), pTyr (4G10+PY72+PY99) y pY155-RLC (8471).

### 3.8. Ensayo de fraccionamiento celular

El protocolo utilizado se describió originalmente en (120), con alguna modificaciones, descritas brevemente a continuación: las células (1 p100/ condición) se

lisaron *in situ* con buffer de lisis conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM NaCl, 140 mM acetato potasico, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM DTT + inhibidores de proteasas y fosfatasas (este tampón estabiliza la NMII ensamblada en la fracción insoluble). Las muestras obtenidas se incubaron durante 10 min en frío y se centrifugaron a  $7800 \times g$  durante 15min a 4°C. Posteriormente se separó el sobrenadante (fracción soluble) del sedimento (fracción insoluble) y se resuspendieron usando buffer Laemmli. La fracción insoluble se resuspendió en un volumen total de Laemmli 2x igual a la mitad del volumen total de fracción soluble resuspendida con Laemmli. Ambas fracciones fueron separadas por PAGE/SDS, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con los anticuerpos indicados en cada caso. El análisis de densitometría fue llevado a cabo usando ImageJ v1.50i (NIH).

### 3.9. Inmunoprecipitación

Las células transfectadas con los plásmidos correspondientes (3 placas p100 por condición) se lisaron con buffer que contenía 50mM Tris-HCl pH7.4, 1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP + inhibidores de proteasas y fosfatasas. La presencia del ATP y el MgCl<sub>2</sub> favorece el desensamblaje de la NMII, maximizando la recuperación de la proteína en el sobrenadante. Se eliminaron los fragmentos insolubles por centrifugación ( $13000 \times g$ , 15min a 4°C), y el sobrenadante fue incubado con 50μL de microesferas de agarosa recubiertas con IgG de ratón (Sigma-Aldrich) durante 2h a 4°C en rotación constante (15 rpm). Después de una centrifugación breve (1 min,  $13000 \times g$ , 4°C), el sobrenadante se incubó con 50 μl de microesferas ferromagnéticas recubiertas con anti-FLAG (clon M2, de Sigma-Aldrich) durante 2h a 4°C en rotación constante (15 rpm). Las microesferas fueron lavadas mediante separación magnética cuatro veces con TBS 1x frío y las proteínas se separaron de las microesferas por incubación con 80μl de buffer Laemmli a 90°C durante 5 min.

### 3.10. Fabricación de sustratos de flexibilidad controlada para microscopía de fuerza de tracción (TFM)

El protocolo utilizado es una adaptación del protocolo descrito originalmente en (121). Brevemente, se recubrieron cubreobjetos circulares de vidrio (1.5H) de 25mm de



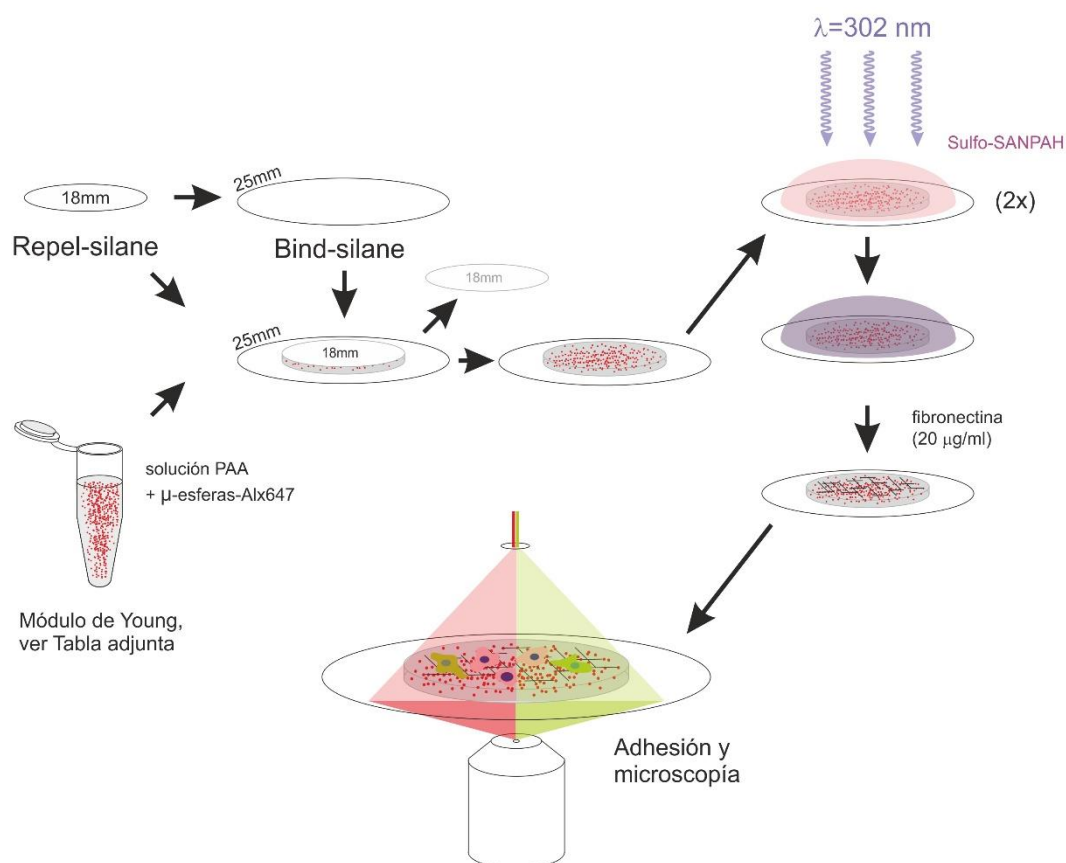
diámetro con 200µl de una mezcla de 0.05% de 3-(de Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (Bind-silane), 2% de ácido acético glacial, y 80% de etanol al 96% (Bind-silane). Por otra parte, tratamos cubreobjetos circulares de vidrio (1) de 18mm de diámetro con 100 µl Repel-silane. Estos tratamientos se llevaron a cabo durante 15 min. Tras este tiempo se dejaron secar ambos tipos de cubreobjetos a temperatura ambiente en una cabina de flujo. En paralelo, se preparó 1ml de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida de la composición requerida para obtener el módulo de Young deseado (ver Tabla M4, adaptada de (121)).

**Tabla M4. Adaptación de proporciones de reactivos para fabricar geles de PAA.**

E (kPa)	% Acrilamida 40%	% Bisacrilamida 2%	Hepes 10mM	TEMED	APS 10%
1	75	40	885	0.5	4
5	125	75	800	0.5	4
10	200	62.5	737.5	0.5	4
20	250	50	700	0.5	4
30	250	75	675	0.5	4

Esta mezcla se preparó en presencia de 30µl/ml de microesferas (0.2 µm) fluorescentes conjugadas a Alexa647 y se usó TEMED y 10% persulfato amónico para catalizar la reacción de formación del gel. Los geles se generaron usando un volumen de 28µl de la mezcla que se colocó entre ambos cubreobjetos. Pasados 10 min, se retiró el cubreobjetos de 18mm y se sumergieron los cubreobjetos de 25mm con los geles adheridos en PBS 1x a temperatura ambiente. Examinamos brevemente los geles en un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse Ti-E) para descartar aquellos geles con imperfecciones evidentes (agujeros, bordes cuarteados, etc.). Los geles sin imperfecciones se activaron por inmersión en una solución conteniendo Sulfo-SANPAH (1mM), 0.5%DMSO y 50mM HEPES. Esta solución se irradió sobre el gel con luz UV de 302nm procedente de una lámpara 3UV (8W) (Thermo-Pierce). La muestra se irradió horizontalmente a 10 cm durante 20min. Reemplazamos la solución oscurecida de Sulfo-SANPAH por solución fresca y repetimos el proceso. Posteriormente, los geles

activados se lavaron cinco veces con 10ml de agua miliQ y se incubaron con una solución de HBSS con 20 $\mu$ g/ml de fibronectina humana durante toda la noche a 4°C. Los geles se usaron en las 24h siguientes a su preparación para evitar cambios en sus propiedades mecánicas debidos a la absorción de líquido en el gel (**Figura M1**).



**Figura M1.** Esquema de los procedimientos seguidos para generar los geles de PAA. Los cristales de diferente tamaño fueron tratados y usados como molde de la mezcla de PAA para una simular una rigidez determinada (**ver tabla M4**). Una vez gelificada la PAA fueron funcionalizados con fibronectina usando sulfo-SANPAH como entrecruzador.

### 3.11. Microscopia confocal

Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Leica TCS SP5 II equipado con un objetivo 63 $\times$  PlanAPO (NA1.40), un sistema de filtrado de luz espectral y detectores híbridos (HyD). Los láseres utilizados para iluminar la muestra fueron: Diodo, 50 mW (405 nm); Ar, 65 mW (488nm); DPSS, 20 mW (561nm); HeNe, 10 mW (633 nm). Las imágenes fueron capturadas en modo secuencial a 1024 $\times$ 1024 pixel a una velocidad de 400Hz. Para la captura de imágenes en tiempo retardado (*time-lapse*), el microscopio cuenta con un incubador de temperatura, CO<sub>2</sub> y humedad

controladas (Okolab), platina motorizada y un adaptador de cubreobjetos de 25mm (Attofluor, Thermo), en los que se incubaron las células en 1ml de medio de filmación (20 mM HEPES pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, mOsm=300). Los vídeos de TFM se adquirieron a 800×800 pixel a 700Hz. Se tomó un juego de 4 cortes confocales por imagen a 0.5µm de distancia en el plano Z cada 20s durante 25min. Al finalizar el vídeo, se añadió a la muestra 100µl de una solución de SDS al 10%, para lisar las células. Posteriormente se capturaron dos imágenes más para obtener una imagen del gel “relajado”, es decir, sin células. Tanto las imágenes de células fijadas como las correspondientes a los vídeos de tiempo retardado fueron capturadas usando software Leica TCS.

### 3.12. Análisis cuantitativo de adhesiones

Para la cuantificación del tamaño y número de las adhesiones (área adhesiva) las imágenes fueron analizadas con el software de dominio público Image J (NIH). Se cuantificó como se indica en (122). Brevemente, se redujo el fondo (*reduce background*), se aplicó el algoritmo CLAHE (Contrast-Limited Adaptive Histogram Equalization) para crear una imagen altamente contrastada y se cuantificó las adhesiones usando la función incorporada (“*Analyze particles*”) de ImageJ. El porcentaje de área adhesiva fue obtenida dividiendo el área adhesiva de la célula, determinada como se ha descrito anteriormente, entre el área total de la célula determinada manualmente. Al menos se cuantificaron 25 células por condición.

### 3.13. Análisis de los vídeos de TFM

La cuantificación de las tracciones la llevaron a cabo en colaboración con el grupo de la doctora Arrate Muñoz Barrutia. Brevemente, para estimar las tracciones generadas por las células en el sustrato a lo largo del tiempo, se usaron las imágenes adquiridas por microscopia confocal de los geles con las esferas fluorescentes embebidas: una imagen del gel en reposo (después de eliminar la célula) y otras tomadas en distintos puntos temporales con los geles deformados por la acción de la célula unida al sustrato. De esta manera, para cada instante de tiempo, el campo de desplazamientos de las esferas fluorescentes se estimó usando un algoritmo

ampliamente usado en experimentos TFM: Velocimetría de Imágenes de Partículas (PIV) (123) basado en un registro rígido entre las dos imágenes mediante la correlación de éstas. Para inferir las tracciones ejercidas por las células a partir de los desplazamientos de las esferas fluorescentes es necesario resolver un problema inverso mal condicionado (se tienen más incógnitas que datos), por lo que es necesario aplicar algoritmos de regularización para estabilizar la solución. En este caso se usó la regularización de Tikhonov (o de norma L2), método clásico en experimentos de TFM, ya que existe una implementación muy eficiente en el dominio de Fourier que permite recuperar las tracciones con un buen compromiso entre precisión de los resultados y carga computacional (124).

### **3.14. Evaluación de la migración celular por microscopía de tiempo retardado**

Tras 96h de transfección, las células positivas para los mutantes de RLC acopladas a GFP fueron separadas por citometría de flujo preparativa (“*sorting*”) en un citómetro FACS Aria I (Becton Dickinson). Se recolectaron 100,000 células positivas (tiempo medio, 30 min/condición). Las células se sembraron a 20,000 células/cm<sup>2</sup> en pocillos de  $\mu$ -Slide 4 Well Glass Bottom (Ibidi) recubiertos con 2  $\mu$ g/ml de fibronectina en medio de filmación. Tras 2h de adhesión, se filmaron cuatro campos de campo claro de cada condición durante 6h (1 imagen cada 5 min) en un microscopio Olympus IX83 equipados con un objetivo 20x, NA0.75, incubador de temperatura, CO<sub>2</sub> y humedad controladas (Pekon) y platina motorizada. Las imágenes se capturaron usando el software Xcellence, de Olympus, y se analizaron con el *plugin* “Chemotaxis and Migration Tool” (Ibidi) para ImageJ.

### **3.15. Medida de recuperación de fluorescencia tras foto-extinción (*Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP*)**

Las imágenes se capturaron en el microscopio Leica TCS SP5 II descrito anteriormente (63). Brevemente, se dibujó una ROI (*region of interest*) definiendo un área celular (35  $\mu$ m<sup>2</sup>) que contenía los filamentos de miosina marcados con GFP. Esta región se escaneó tres veces para determinar el nivel inicial de fluorescencia. A

continuación se foto-extinguió la ROI con 30 escaneos del láser de 488nm al 100% de potencia. La recuperación de fluorescencia se grabó con 15 escaneos cada 0.06s, 15 escaneos cada 1s y subsecuentemente escaneos cada 3-5s. Por último se sustrajo el fondo, se calculó la normalización usando una función algorítmica integrada en el software TCS de Leica y se representó la intensidad normalizada versus tiempo (sec). Los datos del FRAP son siempre representados como la media  $\pm$  SE de 24 medidas individuales por condición en cuatro experimentos independientes.

### 3.16. Fosfoproteómica basada en espectrometría de masas

La fosfoproteómica se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Donald Hunt (School of Chemistry, University of Virginia, USA), adaptando un protocolo descrito anteriormente (125). Brevemente, las células HEK-293 se transfectaron con FLAG-RLC *wild type* y se mantuvieron en medio DMEM durante 24h. Para inhibir la actividad fosfatasa, las células fueron tratadas con 1 $\mu$ M de peroxovanadato y 10nM de caliculina A 30 min antes de la lisis. La lisis se realizó en un buffer que contenía 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM ATP con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se realizó la inmunoprecipitación usando agarosa conjugada con FLAG. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con buffer de lisis sin inhibidores de proteasa y se eluyeron usando 100 $\mu$ g/ml de péptido FLAG.

Posteriormente el inmunoprecipitado de FLAG-RLC fue preparado para análisis proteómico. El inmunoprecipitado fue reducido a temperatura ambiente (RT) durante 1h con dithiothreitol (DTT) a una concentración final de 0.05mM y alquilado durante 45 min a RT con iodoacetamida (IAD) en una concentración final de 0.12mM. La proteína unida fue digerida usando endoproteinasa Glu-Cen en un ratio de 1:20, enzima a proteína, durante 6h a RT y en agitación constante. La mezcla de péptido inmunoprecipitado fue liberado de las microesferas por acidificación a pH4.0 con ácido acético glacial.

Para la separación de péptidos, se usó un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap (Thermo Scientific) provisto de un láser (P-2000 Sutter Instruments, Novato, CA), para la ionización por electrospray, una bomba (Palo Alto, CA) que impulsaba el flujo, una columna analítica *kasil fritted* (360  $\mu$ m o.d.  $\times$  50  $\mu$ m i.d) fusionada a un capilar de sílice

“precolumna” (360  $\mu\text{m}$  o.d.  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i.d., Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), ambos revestidos con poliimida y rellenos con fase reversa (RP) C18 (ODS-A, tamaño del poro de 120 Å, 5  $\mu\text{m}$  de diámetro) como material empaquetado. Para la disociación por transferencia de electrones (FETD) se usó un equipo Agilent 1100 series de cromatografía líquida binaria (LC).

Se cargó una alícuota de mezcla de péptido en la columna, que se lavó con cinco volúmenes de columna de solvente A (100mM ácido acético). Posteriormente los péptidos se eluyeron en gradiente, al comienzo y al final, con un gradiente del solvente B. al comienzo el gradiente iba de 0% al 60% (70% acetonitrilo, 100mM ácido acético), de aproximadamente 60nL/min. Posteriormente fue incrementado a 100% y fue retenido al 100% durante 20 minutos para el lavado de la columna.

Los espectros completos de la Espectrometría de Masa de Alta Resolución fueron adquiridos con una resolución de 100,000, una diana AGC de 5e5, un tiempo de ionización máximo de 50ms, y un rango de escaneo de 300 a 2000 m/z. Después de 10 escaneos completos, los espectros obtenidos fueron colectados usando los siguientes parámetros instrumentales: dianas AGC de 1e5, tiempo de ionización máximo de 100ms, un micro-escaneo, ventana de aislamiento de 2.0 m/z, y una Energía de Colisión Normalizada (NCE) de 35.

Todos los espectros se buscaron tanto en bases de datos de proteínas RLC y bases de datos de proteínas de *G. gallus* y *H. sapiens* en NCBI NR usando el algoritmo OMSSA (algoritmo de búsqueda abierta de espectrometría de masas) (126). Las búsquedas fueron completadas usando parámetros de digestión GluC, y los precursores y péptidos se ajustaron a  $\pm 0.05$  y  $\pm 0.35$ , respectivamente. La búsqueda de parámetros incluyó modificaciones variables: +56 Da para carbamidometilación de cisteína, +16 Da para la oxidación de metioninas, y +80 Da para la presencia de un grupo fosfato en residuos de serinas, treoninas, y tirosinas.

Los resultados de las búsquedas fueron sujetos a interpretación manual con el fin de identificar y determinar la secuencia y los sitios de modificación.

# Resultados

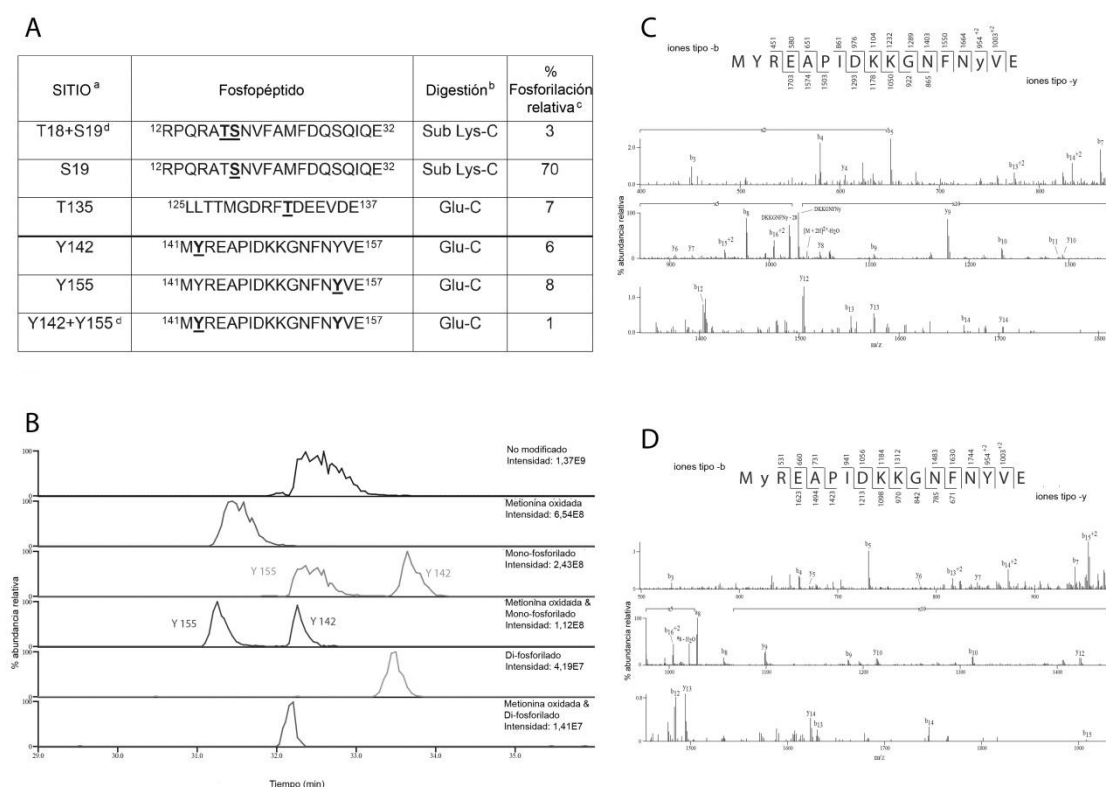
## 4. Resultados

### Parte 1

#### 4.1.1. La cadena reguladora de la miosina no muscular de clase II (*Regulatory myosin Light Chain*, RLC) se fosforila en tirosina en respuesta a factores de crecimiento.

El modelo canónico de regulación de la actividad y estado conformacional de la miosina no muscular de clase II (NMII) requiere la fosforilación de la cadena ligera reguladora (RLC) en Thr y Ser, específicamente Ser19 (12,13, 127). Sin embargo, otros estudios demostraron que la RLC también se fosforila en Tyr (128). En este estudio, nos hemos centrado en estudiar la contribución de las fosforilaciones en Tyr de la RLC a la función celular de NMII. Para ello, comenzamos por reproducir los datos originales que demostraban dichos eventos de fosforilación. Optamos por realizar estos experimentos mediante espectrometría de masas, que se ha utilizado recientemente para determinar el espectro de fosforilación de diversas proteínas implicadas en migración celular (129-131). Para estudiar el estado de fosforilación de Tyr de la RLC en células, transfectamos células HEK-293 con una forma salvaje de la RLC acoplada a FLAG (FLAG-RLC wt) y las tratamos con peroxovanadato, que minimiza la defosforilación de Tyr por inhibición de Tyr fosfatasas (125). Después, inmunoprecipitamos la RLC mediante un anticuerpo anti-FLAG acoplado a sefarosa, y dichos inmunoprecipitados se analizaron mediante espectrometría de masas. Estos análisis revelaron una robusta (5-10%) fosforilación de dos Tyr, Y142 e Y155 (**Figura R1**), además de las fosforilaciones ya descritas para la RLC (T18 y S19), T18+S19 simultáneamente y una Thr adicional, T135 (**Figura R1**). Por el contrario, la fosforilación en el tercer residuo de Tyr presente en la secuencia, Y69, no fue detectada.

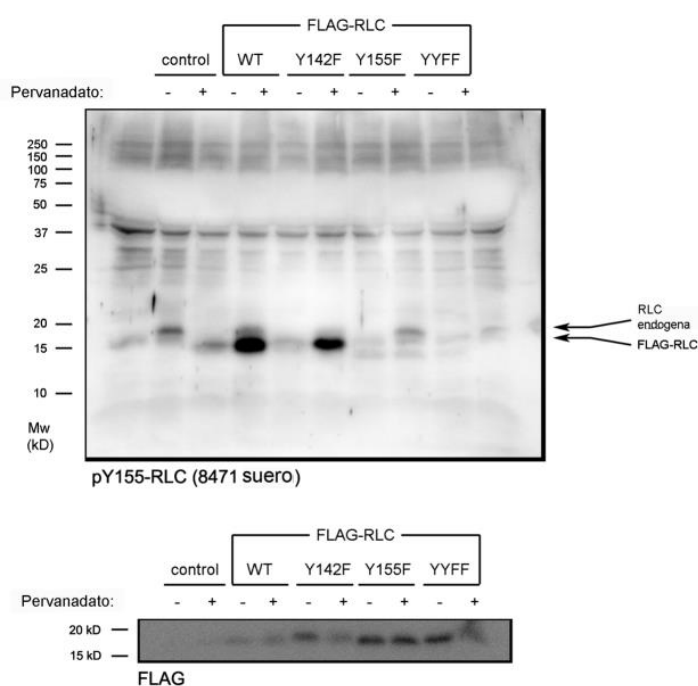




**Figura R1. Identificación de residuos fosforilados en la RLC por espectrometría de masas.** (A) Péptidos fosforilados de RLC identificados por espectrometría de masas. Los residuos fosforilados están subrayados en negrita en la secuencia. Notas: <sup>a</sup> los residuos fosforilados se confirmaron manualmente; <sup>b</sup> los residuos fosforilados fueron determinados a partir de péptidos generados mediante digestión proteolítica con Glu-C seguida por digestión con Lys-C; <sup>c</sup> el porcentaje de fosforilación relativo se calcula dividiendo el área del pico de la forma fosforilada del péptido sobre el área del pico total de todas las formas del péptido; <sup>d</sup> se identifican dos péptidos difosforilados. (B,C) Espectros CAD MS/MS adquiridos en una trampa iónica de  $[M+2H]^{2+}$  ion ( $m/z$  1077.99), que corresponden a los péptidos digeridos GluC de RLC MYREAPIDKKGNFNyVE (B) fosforilados en Y155 y (C) fosforilados en Y142. Se identifican los iones de tipos b2- e y2- encima y debajo de la secuencia peptídica, respectivamente. Los iones identificados se indican también en el espectro y son suficientes para determinar el sitio de fosforilación. (D) Cromatograma iónico extraído del péptido RLC 141-MYREAPIDKKGNFNyVE-157 no modificado, con una metionina oxidada, monofosforilada con o sin metionina oxidada y difosforilada con o sin metionina oxidada, para mostrar la abundancia relativa de estas especies.

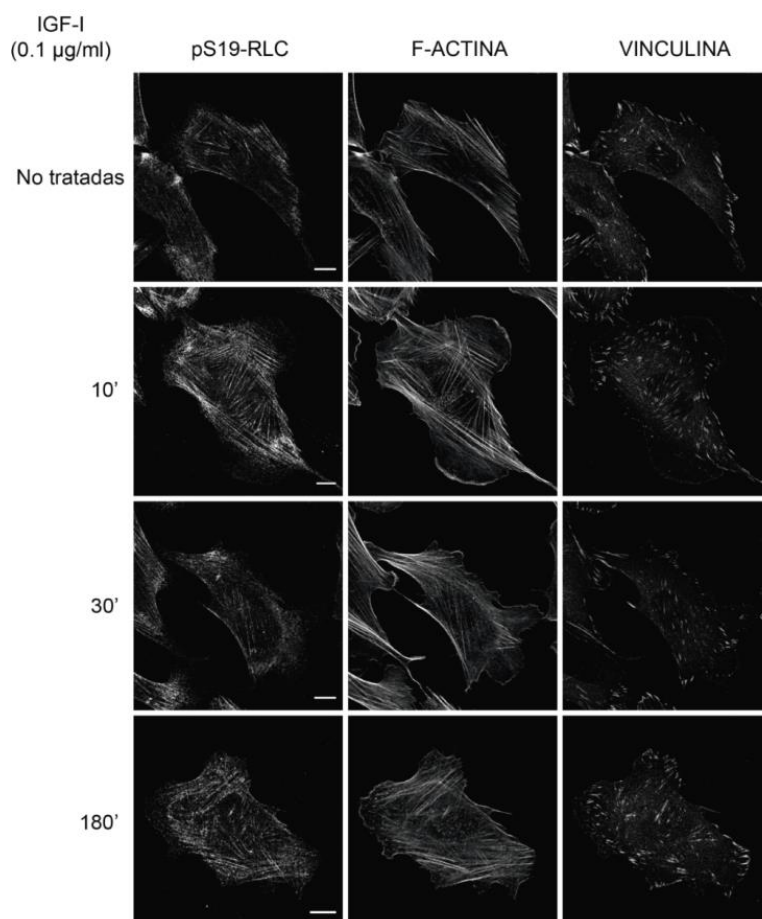
Para poder estudiar estas fosforilaciones de manera específica, intentamos obtener anticuerpos que reconocieran estas fosforilaciones en el contexto de la RLC, inmunizando conejos con péptidos fosforilados acoplados a KLH (ver Materiales y Métodos). De los cuatro anticuerpos obtenidos (dos contra Y142 y dos contra Y155), sólo uno de ellos (generado contra el péptido que contenía Y155 fosforilada) era específico. Este anticuerpo (8471) reconocía una banda endógena de aproximadamente

20 kD que se inducía por tratamiento de células CHO.K1 con peroxovanadato (**Figura R2**, banda marcada como “RLC endógena”). Además, este anticuerpo reconocía FLAG-RLC *wild type* y un mutante (Y142F), en el que Y142 no es fosforilable, pero Y155 sí lo es (**Figura R2**, banda marcada como “FLAG-RLC”). Por el contrario, el anticuerpo no reconocía esta banda en el mutante Y155F ni en un doble mutante de ambas Tyr (YYFF) (**Figura R2**). Además, estos resultados fueron similares en experimentos realizados *in vitro* con proteínas recombinantes (**Figura R7**, ver posteriormente).



**Figura R2. Obtención de un anticuerpo funcional que reconoce la fosforilación de la RLC en Tyr155.** Se muestra un Western blot representativo del suero 8471 (dilución 1:1000) en lisados de células CHO.K1 transfectadas (o no) con los mutantes FLAG-RLC indicados y tratados (+) o no (-) con 1μM de pervanadato sódico durante 30 min. Las flechas indican las bandas correspondientes a la RLC endógena así como FLAG-RLC. También se muestra un blot de la misma membrana con anticuerpo contra FLAG como control de carga.

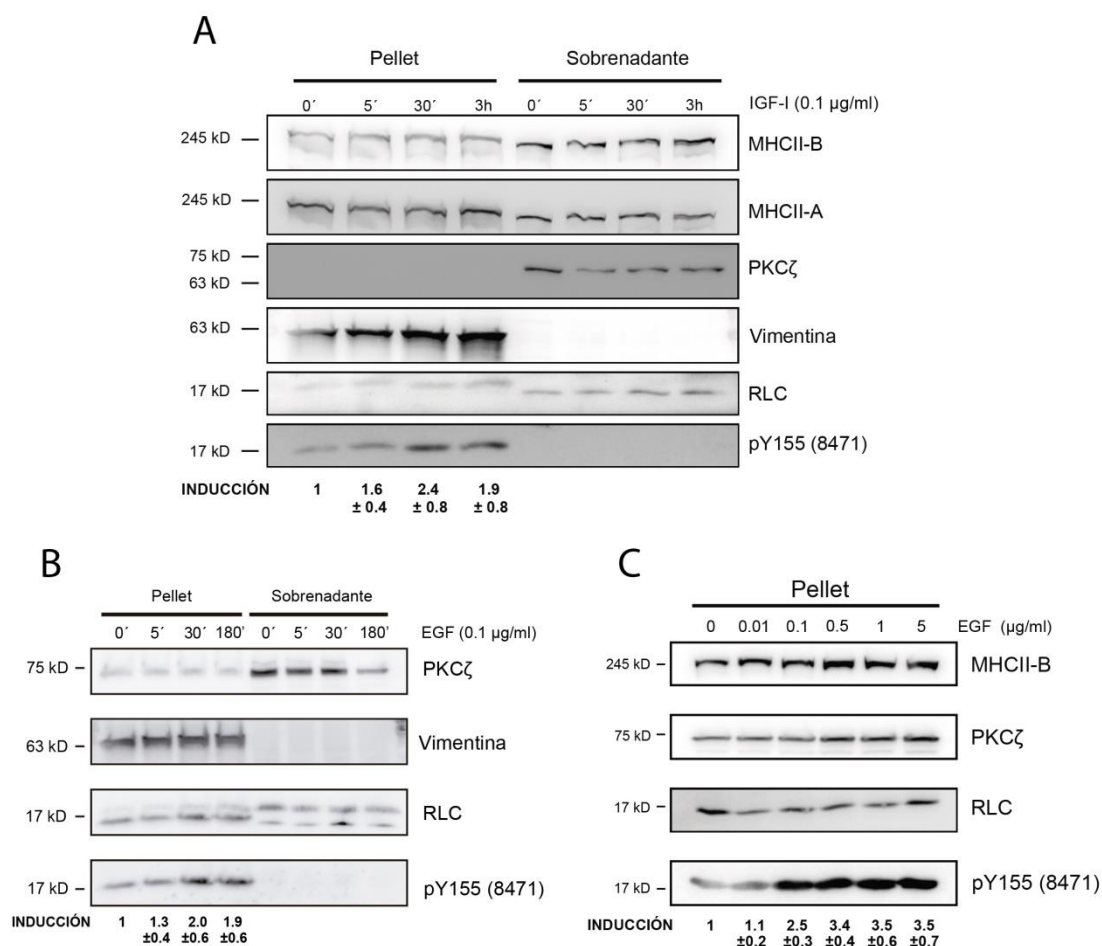
Posteriormente, usamos el anticuerpo 8471 para probar si RLC se fosforilaba en Y155 en células CHO.K1 en respuesta a la estimulación con IGF-I. Estas células, previamente adheridas a cubreobjetos recubiertos con 2 μg/ml de fibronectina y privadas de suero durante 14h, generan lamelipodios rápidamente en respuesta a IGF-I a tiempos cortos de estimulación, entre 2 y 30min. Como se muestra en la **Figura R3**, IGF-I induce protrusiones amplias y desprovistas de haces de actina, similares a las observadas en otros tipos celulares en condiciones similares (62); en cambio contienen actina dendrítica y están decoradas con pequeñas adhesiones nacientes, como las descritas previamente en otras publicaciones (67, 68).



**Figura R3.** El factor de crecimiento IGF-I induce la formación de lamelipodios a tiempos cortos y la formación de haces gruesos de actina y la formación de adhesiones focales alargadas a tiempos largos. Imágenes representativas de células CHO.K1 adheridas a fibronectina (2 $\mu$ g/ml) durante 14h en ausencia de suero, y tratadas durante los tiempos indicados con 0.1 $\mu$ g/ml IGF-I. Las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas como se indica en Materiales y Métodos. Las imágenes son representativas de >500 células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barras de escala = 10 $\mu$ m.

Por el contrario, la exposición a IGF-I durante periodos más prolongados, entre 3-24h, promueve el ensamblaje de haces gruesos de actina y la aparición de adhesiones focales alargadas (**Figura R3**), que es un indicador de su maduración (132).

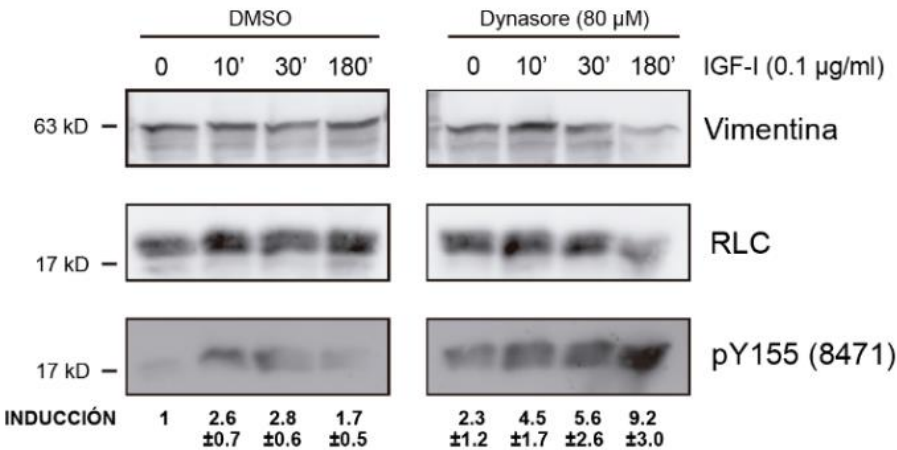
En estas células, el anticuerpo 8471 reveló un incremento en los niveles de fosforilación de RLC en Tyr155 en respuesta a IGF (**Figura R4A**). Un dato muy interesante es que sólo se detectaba fosforilación de la RLC en la fracción insoluble en Tritón X-100. Esta fracción contiene únicamente la NMII que se encuentra formando parte del filamento, y no contiene la NMII que no está ensamblada, es decir, que permanece en forma compacta (10S)(120). Esto sugiere que la RLC fosforilada en Y155 sólo se encuentra asociada a filamentos de actomiosina, y que la NMII en conformación no ensamblada (10S) no está fosforilada en Y155. Realizamos observaciones similares en células A549 (carcinoma humano de pulmón) y HEK-293 (epitelio transformado de riñón humano), las cuales no respondían a IGF, pero sí respondían a EGF (133, 134) (**Figura R4B-C**).



**Figura R4. Los factores de crecimiento promueven la fosforilación de RLC en Y155 en diferentes tipos celulares.** (A) Se trataron células CHO.K1 privadas de suero con 0.1 µg/ml IGF-I durante los tiempos indicados, y se lisadas usando búferes de fraccionamiento como se indica en Materiales y Métodos. Las fracciones “pellet” (Triton-insoluble) y “sobrenadante” (Triton-soluble) fueron separadas por PAGE/SDS, transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos contra los antígenos indicados. Se muestra un experimento representativo. El valor de inducción representa la media ± desviación estándar de la lectura densitométrica de cuatro experimentos independientes. (B) Se trataron células A549 privadas de suero con 0.1 µg/ml EGF y fraccionaron como en (A). Se muestra un experimento representativo, y el valor de inducción representa la media ± desviación estándar de la lectura densitométrica de tres experimentos independientes. (C) Se trataron células HEK-293 privadas de suero con las dosis indicadas de EGF durante 3h y fraccionaron como en (A-B). Se muestra sólo la fracción insoluble en Triton X-100 de un experimento representativo. El valor de inducción representa la media ± desviación estándar de la lectura densitométrica de dos experimentos independientes.

Para determinar si la fosforilación en Tyr de la RLC en respuesta a factores de crecimiento depende de la internalización del receptor de IGF, se incubaron células CHO.K1 con IGF-I en presencia de un inhibidor de dinamina, dynasore, que inhibe la internalización de IGFR-1 mediada por ligando (135). Este inhibidor de la endocitosis

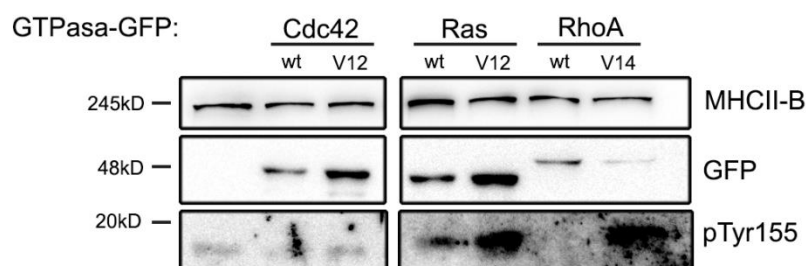
de IGFR-I incrementa la fosforilación de RLC en Y155, lo que indica que la fosforilación de RLC ocurre a nivel de la membrana plasmática y disminuye con la internalización del receptor (**Figura R5**).



**Figura R5. La inhibición de la internalización de los receptores de factores de crecimiento con un inhibidor de la dinamina incrementa la fosforilación en Y155 en células CHO.K1.** Células CHO.K1 privadas de suero fueron tratadas durante 30min con 80μM de dynasore (inhibidor de dinamina) o DMSO (medio control), e inducidas durante los tiempos indicados con 0.1 μg/ml IGF-I y lisados como en (R4.A). Se muestra sólo la fracción insoluble en Tritón X-100 de un experimento representativo. El valor de inducción representa la media ± desviación estándar de la lectura densitométrica de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que la RLC asociada a los filamentos de actomiosina se fosforila en Y155 en respuesta a factores de crecimiento.

Un mecanismo clave en el control de la activación “canónica” de la RLC (vía Ser19) es la activación por GTPasas de la subfamilia Rho. Varias proteínas quinasa que pueden fosforilar RLC en Ser19 se activan en respuesta a estas señales, incluyendo MRCK (vía Cdc42) y ROCK o CitK (vía RhoA). Para estudiar si la activación vía GTPasas favorece la fosforilación en Tyr155 de RLC, sobre-expresamos versiones salvajes (wild type) y mutantes activados (V12 ó V14) de varias GTPasas, incluyendo Cdc42, RhoA y Ras. Los resultados se pueden observar en la **Figura R6**.

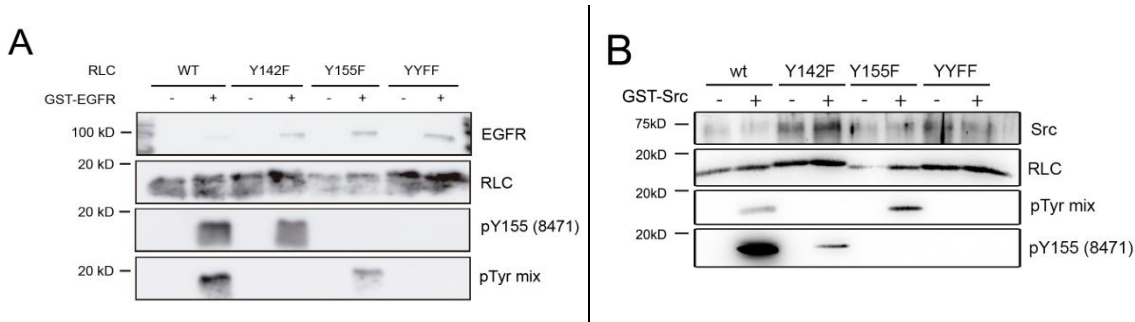


**Figura R6. La activación diferencial de RLC por GTPasas de la familia Ras/Rho altera la fosforilación de la RLC en Tyr155.** Se transfectaron células CHO.K1 con las fusiones de GFP con las GTPasas indicadas (wt:*wild type*; V12, mutante activado de Cdc42 o Ras; V14, mutante activado de RhoA). Tras 24h, las células se lisaron, se separaron por PAGE/SDS y se incubaron con anticuerpos contra las moléculas indicadas. El experimento es representativo de dos realizados.

Los receptores de membrana de IGF (y EGF) pertenecen a la familia RTK de receptores que poseen actividad tirosina quinasa (136), lo que los hace dianas terapéuticas de fármacos antitumorales (137, 138). Dado que la fosforilación objeto de estudio es en Tyr, postulamos que estos receptores podrían inducir la fosforilación de RLC en Tyr155 de manera directa. Para probar esta hipótesis, comenzamos aplicando un algoritmo de predicción de sitios fosforilados por quinasas, ScanSite (v3.0) (139). Scansite predijo que algunos receptores de la familia RTK (PDGFR, EGFR) y algunos miembros de la familia SFK podrían fosforilar RLC en Tyr155. Para comprobar si los miembros de la familia RTK fosforilaban en ese residuo, clonamos y produjimos RLC recombinante (rRLC, ver Materiales y Métodos), así como el dominio quinasa del receptor IGFR-I fusionado con GST. Este dominio resultó no ser funcional *in vitro*, ya que no promovía autofosforilación en presencia de ATP o fosforilación de rRLC. Esto probablemente se debe a que el receptor de IGF, al contrario que los receptores de EGF, necesita dimerizar para fosforilar eficientemente (140). Cuando realizamos los mismos experimentos con una construcción similar del dominio catalítico de EGFR, observamos que el mismo fosforilaba rRLC en Tyr155, como se reveló usando el anticuerpo 8471 (**Figura R7A**). Es interesante observar que la fosforilación en Y155 no se detecta mediante una combinación de anticuerpos contra Tyr fosforiladas (4G10+PY72+PY99), lo que significa que esta fosforilación no posee un entorno reconocible por dichos anticuerpos. Por el contrario, la fosforilación en Y142 sí se detecta (aunque débilmente) en el mutante Y155F mediante la mezcla de anti-Tyr fosforiladas, lo que indica que Y142 también podría ser fosforilada por RTKs, aunque con mucha menos afinidad. Por



otra parte, Scansite predecía que Y142 podría ser fosforilada por proteínas de la familia SFK. Para determinarlo, realizamos experimentos como los descritos anteriormente, utilizando como quinasa una proteína de fusión GST- dominio catalítico de Src. Esta quinasa fosforilaba el residuo Y155 mucho más intensamente en la forma *wild type* que en el mutante Y142F, lo que sugiere que la conformación de RLC Y142F dificulta estéricamente la fosforilación en Y155 (**Figura R7B**). Por otra parte, detectamos una fosforilación bastante intensa del residuo Y142 utilizando la mezcla de anticuerpos anti-fosfo-Tyr, lo que demuestra que este residuo se puede fosforilar en respuesta a quinasas SFK y además que el entorno de Y142 sí es reconocible por los anticuerpos convencionales del tipo 4G10.

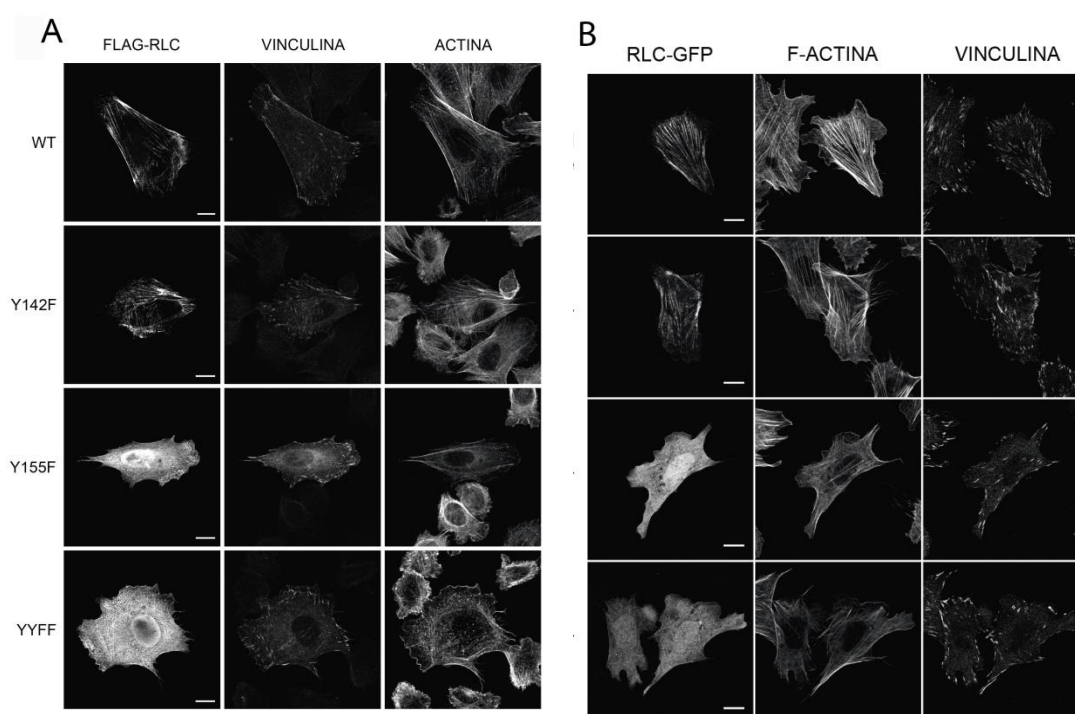


**Figura. R7. La actividad Tyr quinasa del receptor de EGF y Src pueden fosforilar de forma directa la Tyr155 de la RLC.** Ensayo *in vitro* quinasa usando ATP “frío” (no radiactivo), mutantes de RLC recombinante como sustrato y GST-EGFR (A) o GST-Src (B) como quinasa. Los ensayos *in vitro* quinasa se llevaron a cabo durante 15 minutos a 30°C. La reacción se detuvo con buffer Laemmli y los productos fueron separados por PAGE/SDS, transferidos a membrana de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos contra los antígenos indicados. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados.

Estos datos indican que los factores de crecimiento que señalizan a través de receptores de la familia RTK podrían controlar directamente la función de NMII a través de la fosforilación de RLC en Tyr155. Los datos también sugieren que la Tyr142 podría ser fosforilada en respuesta a otro tipo de señales (quinasas de la familia SFK) y que la accesibilidad de las dos Tyr podría estar controlada recíprocamente.

#### 4.1.2. La mutación de Tyr155 a un residuo no fosforilable inhibe la localización de la RLC en los haces de actomiosina

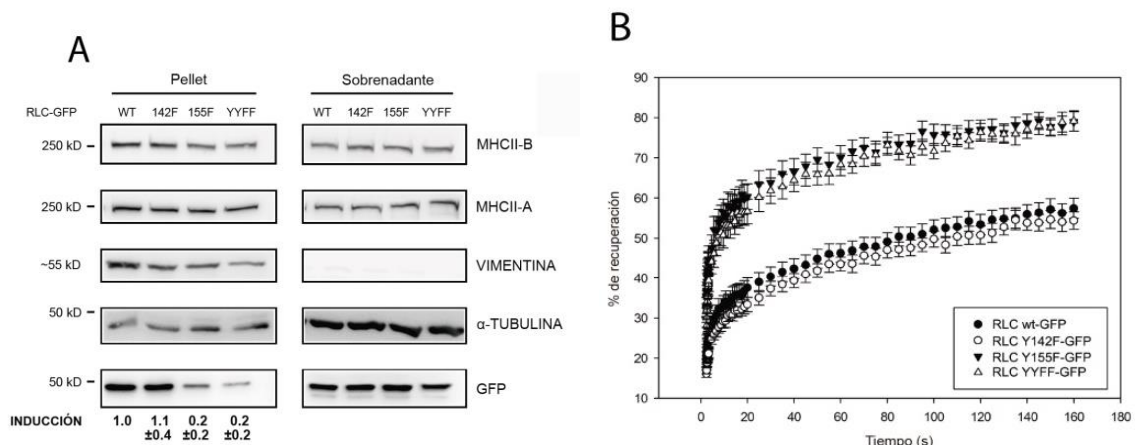
Los datos anteriormente mostrados nos llevaron a postular que la fosforilación en Tyr155 de la RLC constituye un mecanismo regulador de la función de NMII. Para verificar esta hipótesis, generamos mutantes no fosforilables de la RLC en vectores de expresión acoplados a FLAG (FLAG-RLC) o GFP (RLC-GFP). La expresión de FLAG-RLC (**Figura R8A**) o RLC-GFP (**Figura R8B**) reveló que la localización del mutante Y142F era muy similar a la de la forma salvaje (*wild type*), definiendo los haces de actomiosina que se localizan en el centro y la parte posterior de la células. Es interesante resaltar que el mutante Y142F se localizaba principalmente fuera de las protrusiones ricas en actina dendrítica, decorando raramente los mini-filamentos que se forman en protrusiones por nucleación de la NMII, como se ve en las células que expresaban la forma salvaje (**Figura R8A-B**).



**Figura R8. La fosforilación en Y155 es necesaria para la correcta localización de la RLC en filamentos.** (A) Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con los mutantes indicados de RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con FLAG, adheridas sobre fibronectina (2μg/ml) durante 2h y teñidas para visualizar FLAG, vinculina endógena y F-actina. (B) Imágenes de células CHO.K1 transfectadas con versiones de RLC marcadas con GFP y tratadas como en (A). En ambos casos, las imágenes son representativas de >500 células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barras de escala=10μm.



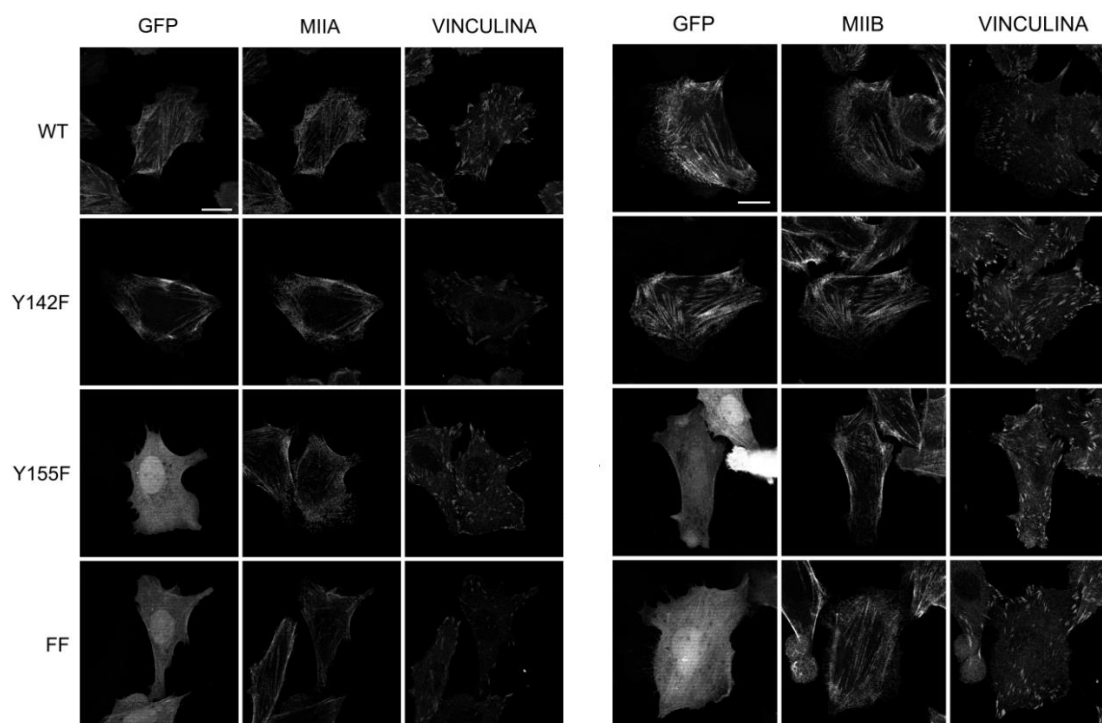
En cambio, los mutantes Y155F e YYFF no se localizaban de manera similar a la forma salvaje. Por el contrario, dibujaban un patrón difuso a lo largo del citoplasma y núcleo, apareciendo sólo ocasionalmente en haces débilmente fluorescentes (**Figura R8A-B**). Estos datos correlacionaban con la distribución de los mutante en ensayos de fraccionamiento en Tritón X-100 (120). En estos ensayos, los mutantes Y155F e YYFF aparecían débilmente en la fracción insoluble de Tritón X-100 (que contenía la NMII ensamblada en filamentos) comparados con el mutante Y142F y la forma *wild type* (**Figura R9**).



**Figura R9. Los mutantes Y155F y YYFF son menos estables en los filamentos de actomiosina que el mutante Y142F y la forma salvaje de la RLC.** (A) Células CHO.K1 fueron transfectadas con los mutantes indicados de la RLC acoplados a GFP o la forma salvaje (*wild type*), adheridas a fibronectina (2 $\mu$ g/ml) y fraccionadas como se indica en la **Figura R4A**. Se muestra un experimento representativo. El valor de inducción representa la media  $\pm$  desviación estándar de la lectura densitométrica de cuatro experimentos independientes. (B) Curvas de recuperación de fluorescencia tras foto-extinción (FRAP) de los mutantes de RLC (o la forma *wild type*) acoplados a GFP. Los experimentos se realizaron como se ha indicado en (A). Los datos mostrados  $\pm$  SD de 24 medidas individuales por condición de cuatro experimentos independientes.

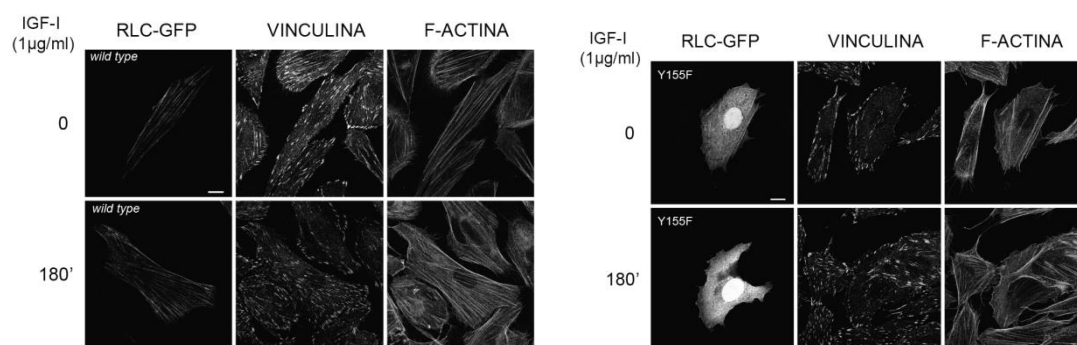
Estos datos indicaban que la fosforilación en Y155 contribuía a la localización de la RLC en haces de actomiosina, sugiriendo que esta fosforilación podría controlar la estabilidad de la RLC en los mismos. Para verificarlo, se realizaron medidas de recuperación de fluorescencia tras foto-extinción (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, o FRAP) en haces de actina decorados con RLC-GFP. Estos experimentos demostraron que tanto el mutante RLC Y155F como el YYFF recuperaban la fluorescencia en el filamento más rápidamente que las formas *wild type* e

Y142F, lo que indica un intercambio más rápido y activo del mutante en el filamento, lo que indica una menor estabilidad (afinidad o aidez) de la molécula en el haz (**Figura R9B**). Por su parte, la tinción de la MHCII-A (que define el parálogo NMII-A) o MHCII-B (parálogo NMII-B) no se veía afectada (**Figura R10**), lo que sugiere que los mutantes que contenían la mutación Y155F tenían menos afinidad que la RLC endógena por los hexámeros de NMII, tanto –A como –B.



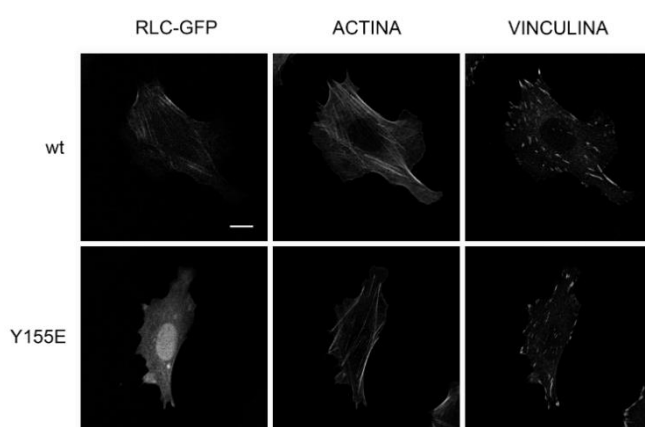
**Figura R10. La mutación Y155F no altera la localización de MHCII-A y MHCII-B.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con los mutantes indicados de RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP y adheridas sobre fibronectina (2µg/ml) durante 2h. Las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos específicos para visualizar vinculina y MHCII-A o MHCII-B como se indica. Las imágenes son representativas de >500 células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

Además, la expresión de los mutantes con Y155F no tuvo efectos significativos en el número o tamaño de adhesiones focales (definidas por la tinción de vinculina endógena) en células adheridas a fibronectina en presencia de suero (**Figura R10**). Por el contrario, la expresión de Y155F e YYFF inhibieron el ensamblaje de haces gruesos de actomiosina en células privadas de suero y tratadas durante 3h con IGF-I (**Figura R11**).



**Figura R11. El mutante Y155F previene la formación de haces gruesos de actomiosina y la elongación de las adhesiones inducida por IGF-I.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con el mutante Y155F RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP y adheridas sobre fibronectina (2µg/ml) durante 14h en ausencia de suero. Las células se trataron durante los tiempos indicados con 0.1µg/ml de IGF-I, se fijaron, permeabilizaron y se incubaron con anticuerpos específicos y faloidina fluorescente para visualizar vinculina y F-actina endógena, respectivamente. Las imágenes son representativas de >500 células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

También intentamos generar el mutante fosfomimético de Y155, en el cual introdujimos la mutación Y→E para aumentar la carga negativa en esta región de la RLC. Sin embargo, esta construcción se comportó como la versión Y→F de la RLC en términos de localización (**Figura R12**), lo que sugiere que este mutante no funciona como fosfo-mimético.



**Figura R12. El mutante Y155→E de RLC se comporta de igual manera que el mutante Y→F.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con el mutante de RLC Y155E (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP. Después del tiempo de transfección las células fueron tratadas como en la **Figura R9** y se tiñeron con los anticuerpos específicos indicados. Las imágenes son representativas de >50 células examinadas en dos experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

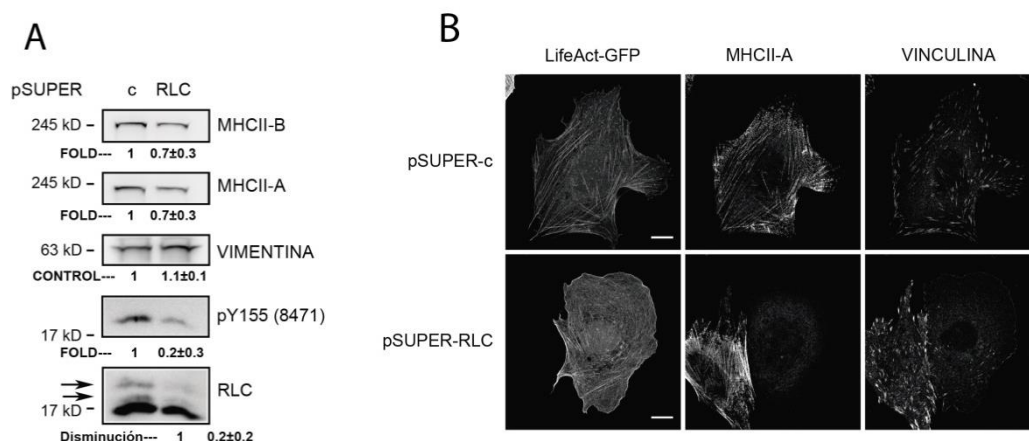
Esto sugiere que la mutación Y→E no imita correctamente la función de la Tyr fosforilada. Este fenómeno no es infrecuente para Tyr, ya que la mutación Y→E tampoco

imita la función de la Tyr fosforilada en las colas de las integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 7$ , por ejemplo (79).

En resumen, los datos presentados indican que la fosforilación en Y155 aumenta la estabilidad de la RLC asociada a los filamentos.

#### **4.1.3. La fosforilación de la RLC en Tyr 155 permite la generación de haces de actomiosina que definen la polaridad anteroposterior de las células migratorias**

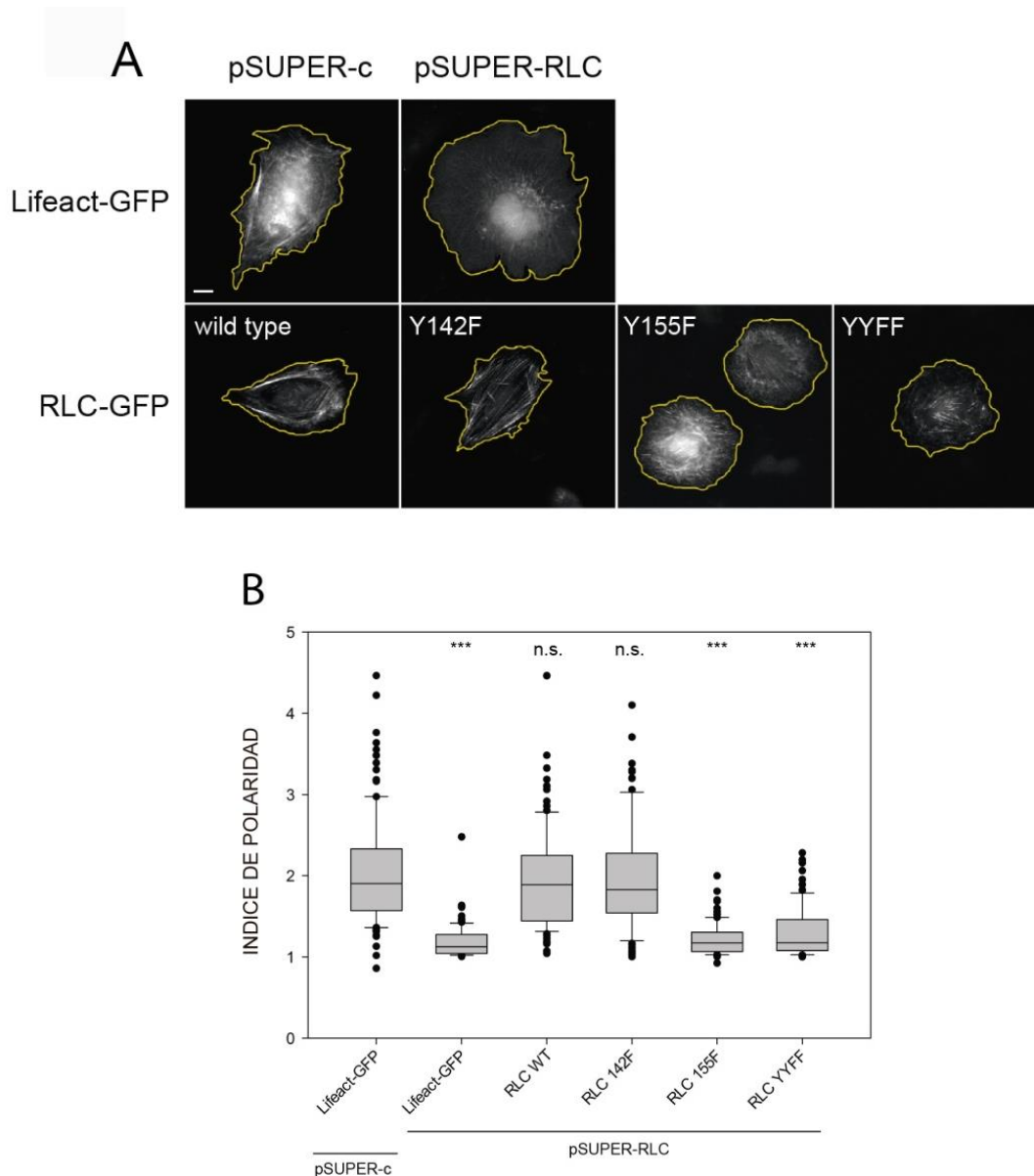
Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la coordinación del ensamblaje de los parálogos NMII-A y NMII-B determina la adquisición de un fenotipo migratorio que incluye la formación de un polo anterior, definido por la presencia de actina dendrítica formando el lamelipodio, y un polo posterior, caracterizado por la acumulación de haces de actomiosina fosforilados en la RLC en los residuos Ser19 y Thr18 (56, 57, 141). Dado que la RLC es esencial para la función de ambos parálogos, nos planteamos el posible papel de la fosforilación Tyr155 en la activación de los parálogos de NMII para coordinar la polaridad anteroposterior. Para hacer esto, primero redujimos drásticamente la expresión de RLC endógena en las células CHO.K1 usando shRNA (ver Materiales y Métodos). La inhibición de la expresión de la RLC endógena causó una disminución de la expresión de las isoformas de la cadena pesada MHCII-A y MHCII-B (**Figura R13A-B**). Esto indica que la RLC es necesaria para la estabilidad del hexámero completo, lo que coincide con datos publicados anteriormente en otros sistemas (142). La disminución de la NMII disponible para formar filamentos debida a la eliminación de la RLC causó una profunda desorganización de los microfilamentos, caracterizada por la reducción del número y tamaño de haces de actomiosina (**Figura R13B**) y una localización difusa de la MHCII-A y MHCII-B restante.



**Figura R13. La inhibición de la expresión de RLC endógena causa una disminución de la expresión de MHCII-A y MHCII-B y un fenotipo aberrantemente protrusivo y con pérdida de polaridad anteroposterior.** (A) Células CHO.K1 fueron transfectadas con pSUPER control y pSUPER-RLC, para inhibir la expresión de RLC endógena. Después de 72h, las células fueron lisadas y los extractos fueron incubados contra los antígenos indicados. Las flechas en el gel de RLC indica la banda más sensible al shRNA. Se muestra un experimento representativo. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SD de la lectura densitométrica de cuatro experimentos independientes. (B) Células CHO.K1 transfectadas como en (A) y adheridas a fibronectina (2 $\mu$ g/ml) durante 2h, fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos para visualizar vinculina endógena y MHCII-A. Las imágenes son representativas de >200 células examinadas en tres experimentos independientes. Barra de escala= 10 $\mu$ m.

Morfológicamente, las células exhibían un incremento anormal de la protrusión y la pérdida de la polaridad anteroposterior (**Figura R13B**). Estos efectos son muy similares a los que se observan a altas dosis del inhibidor general de NMII, blebistatina, o la eliminación simultanea de MHCII-A y MHCII-B (68).

Para determinar la especificidad de los efectos funcionales del silenciamiento de RLC y comprobar la posible existencia de efectos inespecíficos (“off-target”), rescatamos el silenciamiento de la RLC endógena (producto de los genes *MYL12A* y/o *MYL12B* de *C. griseus*) con RLC aviar (producto del gen *MYL9* de *G. gallus* e insensible a la secuencia de inhibición por siRNA usada, ver Materiales y Métodos). La expresión de RLC *wild type* (fusionada con FLAG o con GFP, no observamos diferencias en el rescate debidas al uso de una u otra forma) rescató los efectos funcionales de la eliminación de la RLC endógena, generando de nuevo la formación de haces de actomiosina y restaurando la polaridad anteroposterior (**Figura R14**). La expresión del mutante Y142F en células con la RLC endógena silenciada tenía un efecto similar al de la forma *wild type* (**Figura R14A-B**).

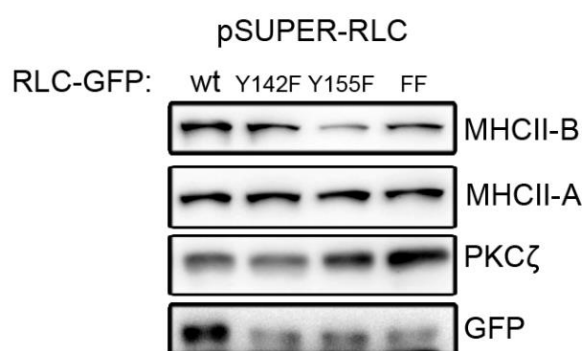


**Figura R14. Los mutantes Y155F e YYFF no restauran la polaridad anteroposterior.** (A) Imágenes representativas de células CHO.K1 co-transfectadas con pSUPER-control y pSUPER-RLC y Lifeact-GFP (control) o los mutantes indicados de RLC-GFP (o la forma *wild type*). Después de 72h, las células se adherieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2µg/ml) durante 2h, se fijaron y tiñeron con anticuerpos contra RLC (para determinar la eficiencia de silenciamiento de la RLC) y faloidina para determinar el contorno de la célula (no se muestran). Se muestran imágenes representativas de la señal de GFP de >200 células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barra de escala= 10µm. (B) Cuantificación de la morfología representadas en (A). El índice de polaridad se calculó como se indica en Materiales y métodos a partir de n>200 células por condición en cuatro experimentos independientes. La significancia estadística fue establecida usando el test no paramétrico Mann-whitney, U. \*\*\*, p<0.001. n.s., no significativo.



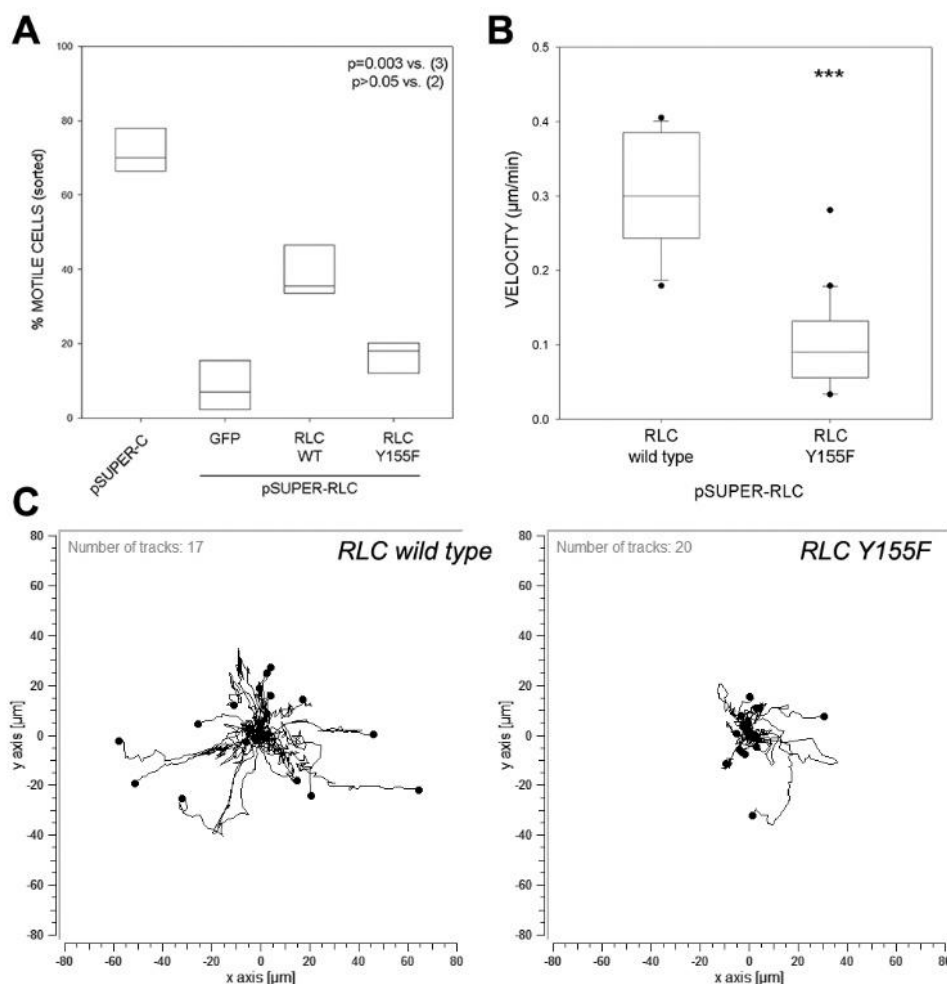
Por otra parte, los mutantes Y155F e YYFF se localizaban en filamentos de manera mucho más clara que cuando se sobreexpresaban (**Figura R14A**). Cuando rescatábamos las células con los mutantes Y155F e YYFF, estos se disponían en haces de filamentos bien definidos, pero estos eran más finos y pequeños que en el caso de la forma salvaje o el mutante Y142F (**Figura R14A**). Estos filamentos eran incapaces de definir el polo posterior de las células, lo cual no permitía el establecimiento de una correcta polaridad anteroposterior (**Figura R14B**).

A nivel de expresión, observamos que, mientras el rescate con el mutante Y142F rescataban la expresión de MHCII-B al mismo nivel que la forma salvaje de la RLC, los mutantes Y155F e YYFF inducían un rescate muy inferior; mientras que la expresión de MHCII-A sí era rescatada por todos los mutantes más o menos por igual (**Figura R15**).



**Figura R15. Los mutantes Y155F e YYFF restaura los niveles de expresión de MHCII-A y MHCII-B.** Se transfectaron células CHO.K1 con pSUPER-RLC para inhibir la expresión de RLC endógena junto con las formas indicadas de RLC-GFP. A las 72h, las células se lisaron, se resolvieron los lisados por PAGE/SDS y se revelaron con anticuerpos contra los antígenos indicados. Se muestra un experimento representativo.

Para determinar el efecto funcional de la falta de fosforilación de la RLC en Tyr155, realizamos experimentos de migración en células silenciadas para la RLC endógena y rescatadas con RLC-GFP *wild type* o el mutante Y155F y seleccionadas por citometría preparativa (“sorting”). Las células se hicieron migrar libremente sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina durante 6h. Estos experimentos demostraron que el silenciamiento de RLC disminuía la fracción de células migratorias (**Figura R16A**) y que el mutante Y155F no era capaz de restaurar ni la fracción de células migratorias (**Figura R16A**) ni la velocidad media de las mismas al nivel de la forma salvaje (**Figura R16B-C**).

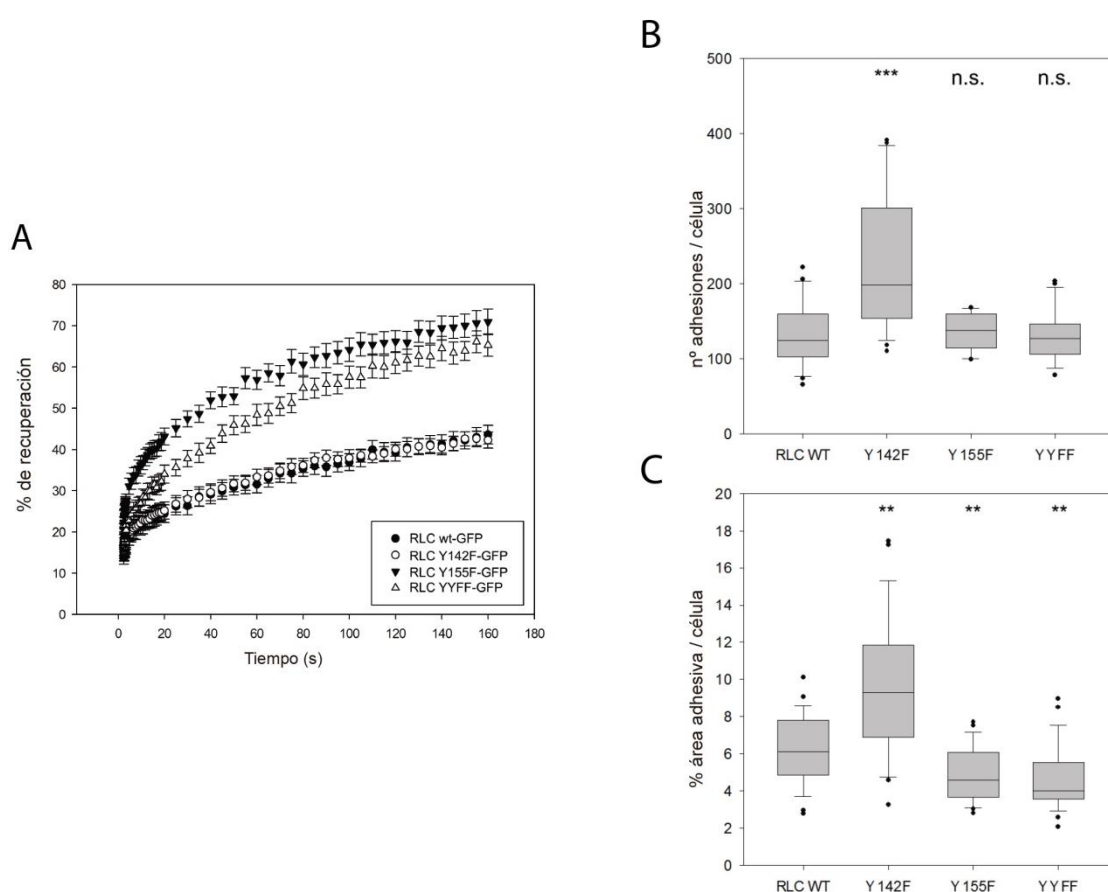


**Figura R16. La fosforilacion en Y155 es necesaria para una migración celular eficiente.** Se transfectaron células CHO.K1 con pSUPER-RLC para inhibir la expresión de RLC endógena junto con RLC-GFP wild type o el mutante Y155F. Después de 72h, las células positivas para GFP se separaron por citometría preparativa y se adherieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina ( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 1h. Posteriormente, las células se filmaron durante 6h usando microscopía de tiempo retardado. (A) y (B) muestran el % de células que se mueven al menos un diámetro en 6h, y la velocidad media de las mismas células, respectivamente. Los datos mostrados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes en los que cuantificaron los parámetros indicados de en  $>75$  células por condición. (C) Representación gráfica de las trayectorias celulares de un experimento representativo con 17 y 20 eventos, respectivamente.

Estos datos nos llevaron a postular la hipótesis de que los filamentos que contenían RLC con la mutación Y155F eran más dinámicos que su contrapartida conteniendo RLC *wild type*. Para ello, realizamos experimentos de FRAP, que demostraron que la recuperación de los mutantes Y155F (e YYFF) era mucho más rápida y completa que la de la forma salvaje (o el mutante Y142F), lo que indica que estabilidad de la RLC en el hexámero de NMII cuando se incorpora al filamento permanecía baja (**Figura R17A**). Por otra parte, el efecto funcional de dicha alteración

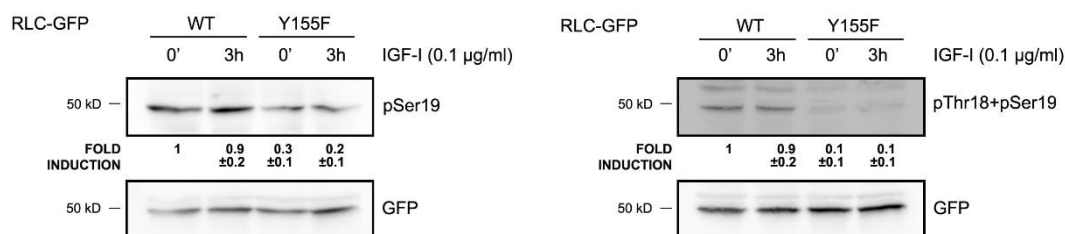


en la estabilidad se vio reflejada en la formación de adhesiones focales. La expresión de los mutantes Y155F fue incapaz de restaurar la superficie celular recubierta con adhesiones focales (que es un indicador del tamaño de las adhesiones focales) a los niveles de la forma salvaje, aunque no afectaba al número de las mismas (**Figura R17B-C**). Por el contrario, el rescate con el mutante Y142F indujo un incremento significativo en el número y tamaño de las adhesiones focales, lo que sugiere que aunque la mutación Y142F no afecta al ensamblaje de la RLC (esto lo miden las curvas de recuperación de fluorescencia en los experimentos de FRAP), sí podría afectar al desensamblaje de la RLC.



**Figura R17. La fosforilación en Y155 incrementa la estabilidad de la RLC en el filamento y es necesaria para la correcta maduración de las adhesiones.** (A) Células CHO.K1 co-transfectadas con pSUPER-control y pSUPER-RLC y Lifeact-GFP (control) o los mutantes indicados de RLC-GFP (o la forma *wild type*). Después de 72h, las células se adhirieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2µg/ml) durante 2h y se realizaron medidas de FRAP como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados son la media ± SE de 24 medidas realizadas en cuatro experimentos independientes. (B) Cuantificación del número y superficie adhesiva (C) de células silenciadas de RLC endógena y transfectadas como se indica. n=30 células/ condición. La significancia (\*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, n.s., no significativo) fue establecida usando el test no paramétrico Mann-whitney U.

Dos estudios previos del grupo habían demostrado que la fosforilación simultánea de la RLC en Thr18 y Ser19 favorecía la polaridad anteroposterior, fundamentalmente a través de su efecto en el parólogo NMII-B (57, 141). Por tanto, postulamos que el mutante Y155F tendría una capacidad muy disminuida de fosforilación simultánea en T18 y S19. Para comprobarlo, nos beneficiamos de la diferente movilidad electroforética de la RLC-GFP (50 kD) comparada con la RLC endógena (20 kD). Eliminamos la RLC endógena con shRNA y expresamos la forma salvaje o el mutante Y155F (recordemos que el silenciamiento de la RLC endógena permite la localización del mutante Y155F en filamentos, como se muestra en la **Figura R14A**). Experimentos de Western blot con anticuerpos específicos para la fosforilación en S19 o T18+S19 demostraron que el mutante Y155F tenía una capacidad reducida para fosforilarse en Ser19, pero casi no se fosforila simultáneamente en T18 y S19 (**Figura R18**), lo que demuestra convincentemente que este mutante no es capaz de restaurar la polaridad porque no puede fosforilarse simultáneamente en T18 y S19.



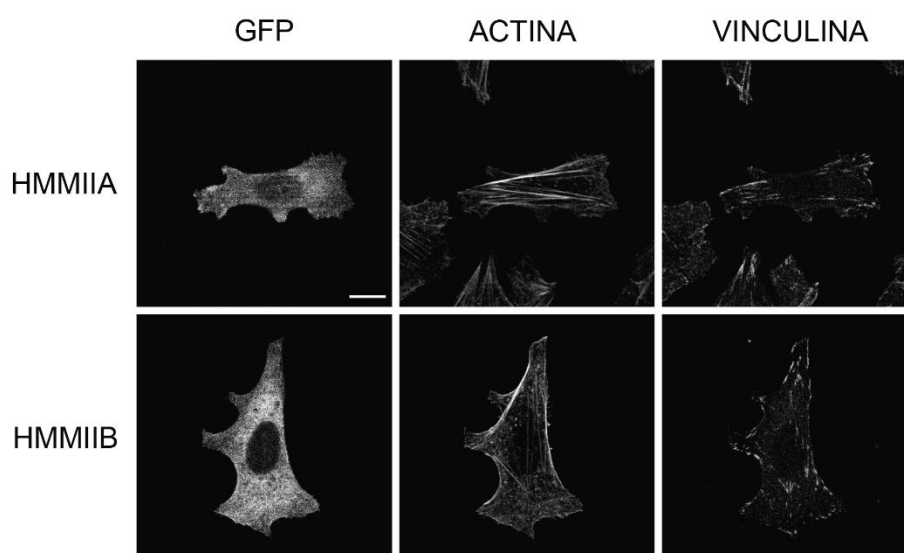
**Figura R18. La fosforilación en Thr18 y Ser19 disminuye si Y155 no está fosforilado.** Se transfectaron células CHO.K1 con pSUPER-RLC para inhibir la expresión de RLC endógena junto con RLC-GF, *wild type* o el mutante Y155F. Después de 72h, las células fueron estimuladas con IGF durante 3h y lisadas. Posteriormente, los extractos separados por PAGE/SDS fueron incubados contra los antígenos indicados. Los datos numéricos indicados son la media  $\pm$  SD de la lectura densitométrica de tres experimentos independientes. Se muestra un experimento representativo de los tres.

En conjunto, estos experimentos demuestran que, aunque la fosforilación Y155 no es estrictamente esencial para la incorporación de la RLC al hexámero de NMII, sí que incrementa la estabilidad de la RLC en la estructura ensamblada, contribuyendo decisivamente a la formación de haces de actomiosina que determinan la polaridad y la estabilidad de las adhesiones. Por otra parte, los efectos del mutante Y142F en el

número y tamaño de las adhesiones sugieren que la fosforilación de Y142 podría inhibir el efecto funcional de NMII, en este caso en la estabilización de la adhesión.

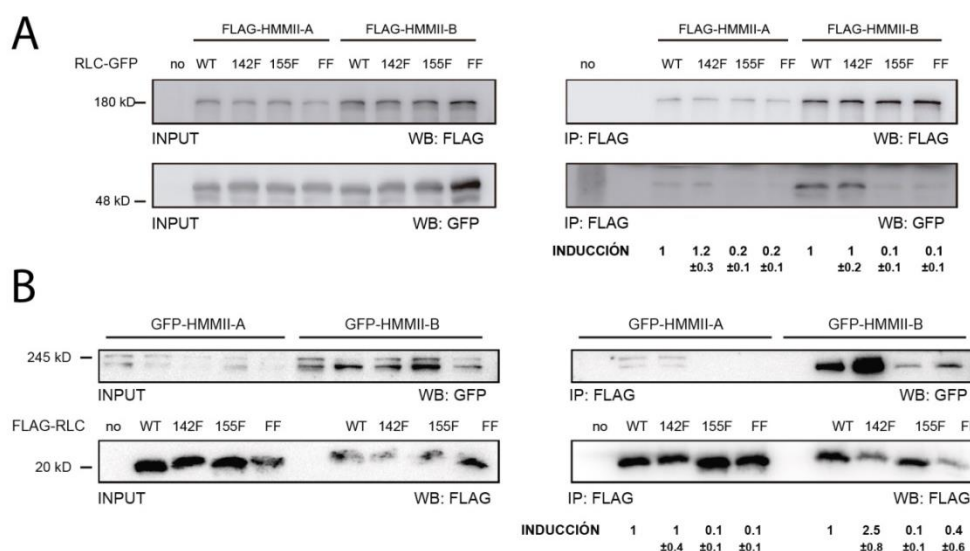
#### 4.1.4. La fosforilación Tyr 155 permite la interacción de la RLC con el hexámero de NMII independientemente del sitio de activación canónico T18/S19

Para determinar si la mutación Y155F disminuye la incorporación de la RLC a la NMII ya incorporada en los filamentos, o por el contrario constituye un mecanismo de control de la interacción de la RLC con la NMII independientemente de la localización del hexámero (ensamblado en filamentos o no), analizamos la interacción de la RLC con fragmentos de MHCII-A Y MHCII-B. Estos fragmentos, similares a la meromiosina pesada (HMMII), poseen el sitio unión que les permite interaccionar con la RLC (y la ELC) para formar hexámeros (143), pero no pueden formar filamentos (**Fig. R19**).



**Figura R19. Las proteínas similares a meromiosinas pesadas no musculares (HMMII) no forman haces de filamentos.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con GFP-HMMII-A o GFP-HMMII-B y adheridas sobre fibronectina (2µg/ml) durante 2h. Las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos específicos y faloidina fluorescente para visualizar vinculina y F-actina endógena, respectivamente. Las imágenes son representativas de > 150 células examinadas en dos experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

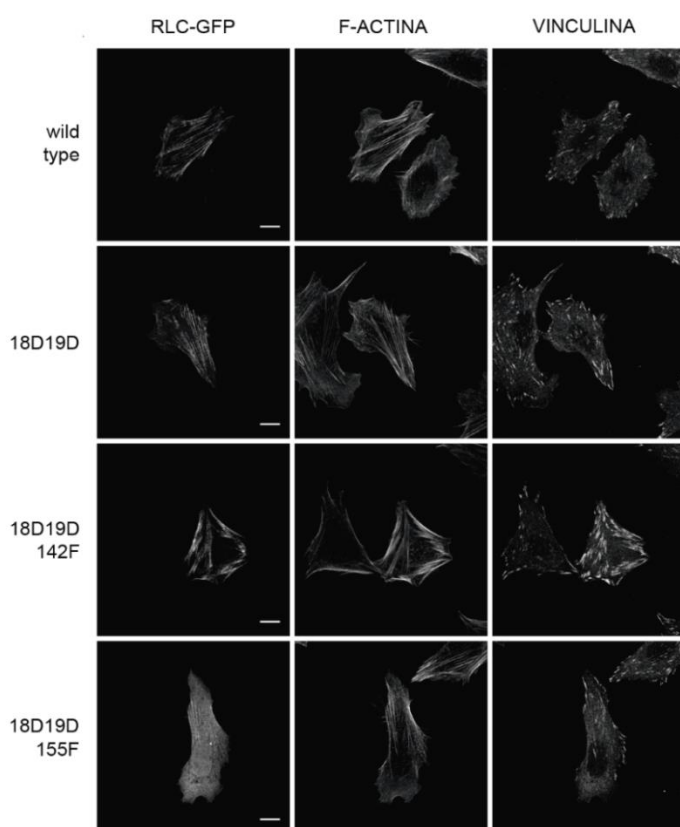
Para determinar la capacidad de interacción de la RLC con la NMII fuera de los filamentos, co-expresamos los fragmentos HMMII marcados con FLAG y los mutantes descritos de la RLC (o la forma salvaje, *wild type*) unidos a GFP, inmunoprecipitando a continuación con un anticuerpo contra FLAG unido a esferas magnéticas. Este experimento reveló que los mutantes Y155F e YYFF interaccionaban mucho más débilmente que la forma salvaje o el mutante Y142F con ambas HMMII, particularmente HMMII-B (**Figura R20A**). Para confirmar este resultado, se hizo la inmunoprecipitación de manera recíproca, usando HMMII marcadas con GFP y mutantes RLC marcados con FLAG. Estos experimentos produjeron unos resultados similares, observándose una capacidad menor de los mutantes conteniendo la mutación Y155F para interaccionar con las HMMII (**Figura R20B**).



**Figura R20. Los mutantes de RLC que contienen la mutación Y155F interaccionan débilmente con HMMII-A y HMMII-B.** (A) Se co-transfectaron células CHO.K1 con FLAG-HMMII-A o FLAG-HMMII-B y los mutantes indicados de RLC o la forma *wild type* acoplados a GFP. Tras 24h, las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Los inmunoprecipitados fueron separados por PAGE/SDS, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos contra FLAG o GFP como se indica. Se muestra un experimento representativo. El valor inducción representa la media  $\pm$  SD de la lectura densitométrica de cuatro experimentos independientes. (B) Se co-transfectaron células CHO.K1 con GFP-HMMII-A o GFP-HMMII-B y los mutantes indicados de RLC o la forma *wild type* acoplados a FLAG. Tras 24h, las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo contra el epítipo FLAG. Los inmunoprecipitados fueron separados por PAGE/SDS, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos contra FLAG o GFP como se indica. Se muestra un experimento representativo. El valor inducción representa la media  $\pm$  SD de la lectura densitométrica de cuatro experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que la fosforilación Y155 controla la incorporación y estabilidad de la RLC al hexámero NMII, y que su efecto en la estabilidad en el filamento de actomiosina es debido a su intercambio en la NMII.

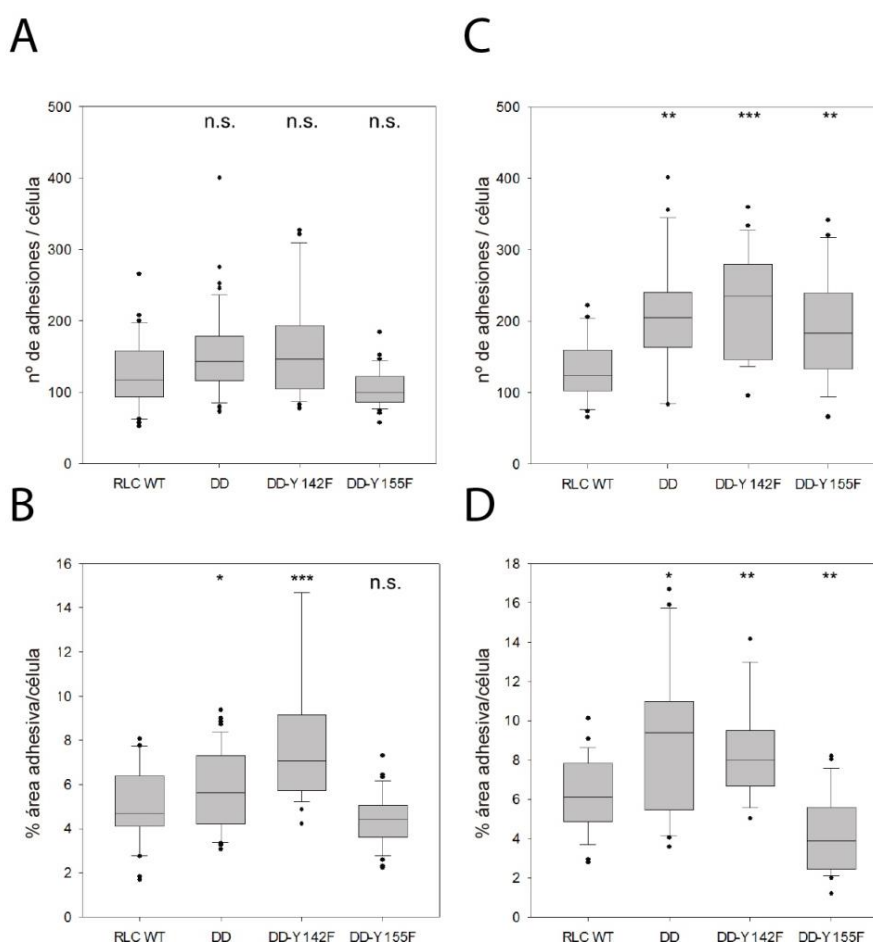
Estudios previos del grupo revelaron que la expresión de un mutante difosfomimético de la RLC en los sitios de regulación canónicos (Thr18+Ser19) promueve la formación de haces de actomiosina estables que promueven la polaridad anteroposterior de forma dependiente de NMII-B. Esto se debe a que la NMII-B activada por difosforilación inhibe la señalización protrusiva (56, 57). De acuerdo con nuestros resultados, la fosforilación en Y155 sería un paso previo a la activación mediante fosforilación en T18/S19. Para comprobarlo, generamos triples mutantes de la RLC, T18D+S19D+Y142F (DD-142F) y T18D+S19D+Y155F (DD-155F) y comparamos su efecto con la expresión de la forma salvaje o el mutante T18D+S19D (DD) (**Figura R21**).



**Figura R21. La fosforilación en Tyr155 previene el efecto polarizante de un mutante fosfomimético de RLC en T18/S19 alterando su localización en filamentos.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con los mutantes indicados de RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP y adheridas sobre fibronectina (2 µg/ml) durante 2h. Las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos específicos y faloidina fluorescente para visualizar vinculina y F-actina, respectivamente. Las imágenes son representativas de >300 células examinadas en tres experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

El mutante DD142F se localizaba mayoritariamente en haces gruesos de actomiosina. Hay que destacar que el efecto polarizador de la mutación T18D+S19D era inhibido por la mutación Y142F (ver ejemplo en **Figura R21**), lo que sugiere una alteración en la capacidad de unión de la RLC al filamento. En este sentido, la

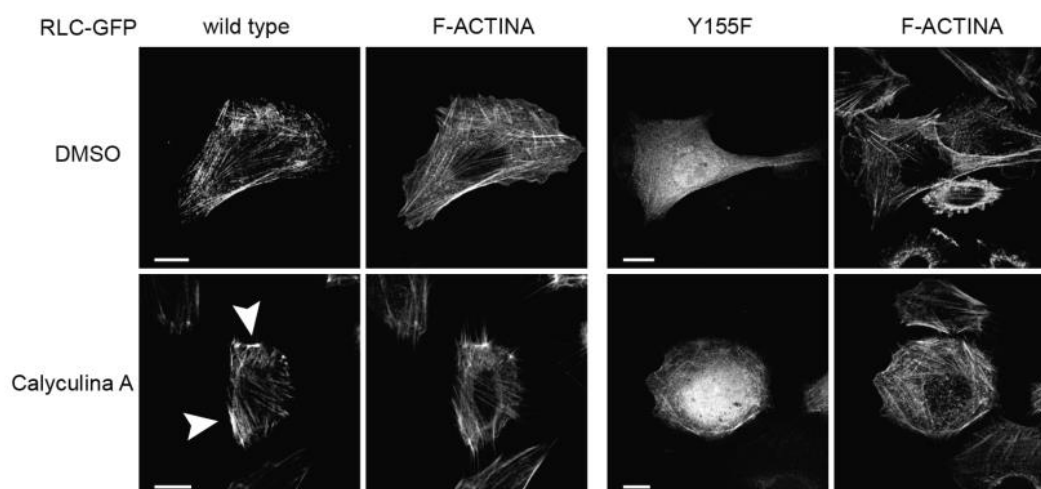
sobreexpresión del mutante DD-142F promovía un incremento de la superficie celular adhesiva mucho más significativo que el causado por el mutante DD (**Figura R22B**). Sin embargo, ninguno de los dos tuvo un efecto en el número de adhesiones (**Figura R22A**), lo que indica que estos efectos están relacionados con una mayor estabilidad, en la capacidad de ensamblaje. La defosforilación de Y142 podría sinergizar con la fosforilación T18/S19 para mejorar la estabilización de NMII y subsecuentemente maduración de las adhesiones focales. El efecto fue más dramático cuando este mutante fue usado para rescatar la eliminación de la RLC endógena (**Figura R22C-D**).



**Figura R22. La fosforilación en Tyr155 es necesaria para que la fosforilación T18/S19 promueva el crecimiento y maduración de las adhesiones.** Cuantificación del número y superficie adhesiva de células transfectadas con los mutantes indicados de RLC (A-B) o co-transfectadas con pSUPER-RLC y los mutantes indicados de RLC-GFP (o la forma *wild type*) (C-D). Después de 24h (A-B) o 72h (C-D), las células se adhirieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2µg/ml), se visualizó vinculina endógena como marcador fiduciario de las adhesiones y se cuantificaron los parámetros indicados como se indica en materiales y métodos de n=30 por condición. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, n.s., no significativo.



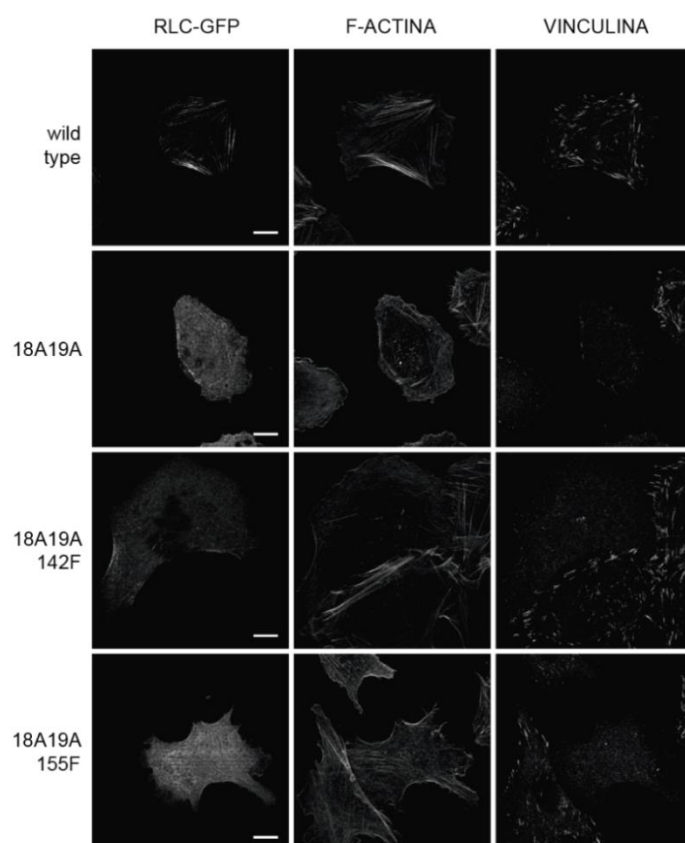
Por el contrario, DD155F se localizaba de manera difusa en el citoplasma de manera muy similar al mutante Y155F (**Figura R21**). Además, este mutante rescataba pobremente los efectos de silenciamiento de la RLC endógena en términos de superficie adhesiva (aunque era más eficaz que la forma salvaje formando adhesiones, estas eran mucho más pequeñas en proporción, **Figura R22A-D**). Estos experimentos se confirmaron farmacológicamente usando el inhibidor caliculina A, que inhibe la fosfatasa de miosina MYPT1, aumentando la fosforilación en T18/S19 (144). Un tratamiento corto (5 min) promovió el agrupamiento de la forma salvaje de la RLC en filamentos hipercontraídos (**Figura R23**, cabezas de flecha), mientras que no tuvo efecto en la localización del mutante Y155F.



**Figura R23. El mutante Y155F no se acumula en haces de filamentos al incrementar los niveles de fosforilación de RLC en T18/S19.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con los mutantes indicados de RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP y adheridas sobre fibronectina (2µg/ml) durante 2h. Las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con faloidina fluorescente para visualizar F-actina. Las imágenes son representativas de >200 células examinadas en dos experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

Globalmente, estos datos indican que la activación fosfomimética de los residuos reguladores T18 y S19 no compensa los efectos inhibidores del mutante Y155F, sugiriendo que el mecanismo control dependiente de fosforilación en Tyr155 es anterior a la fosforilación de la RLC en T18/S19, controlando su incorporación en el filamento de NMII independientemente del efecto de la fosforilación T18/S19.

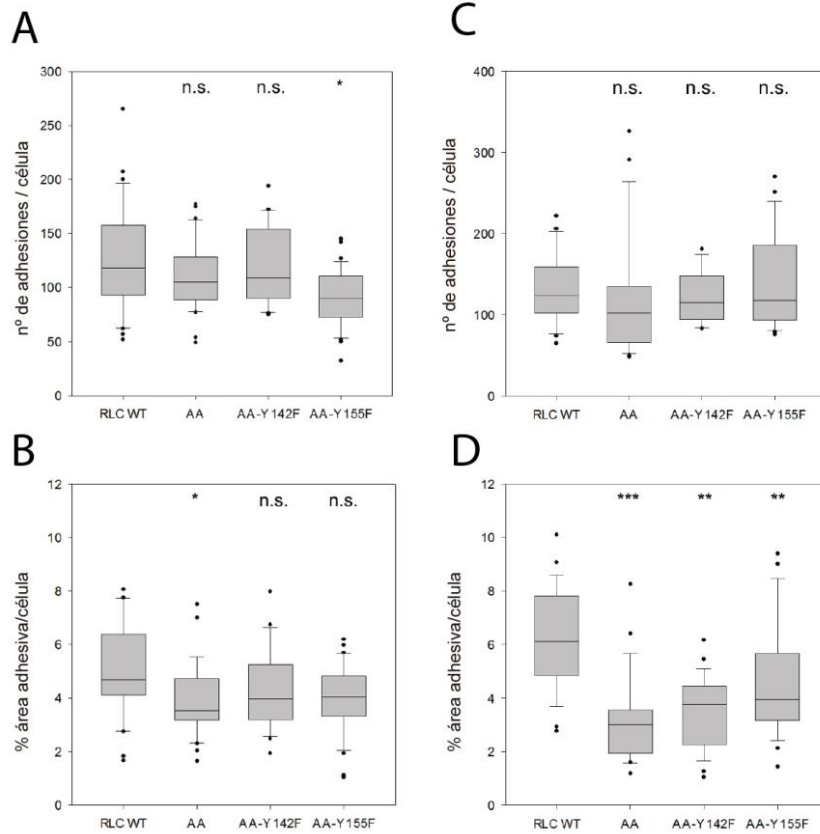
Sin embargo, estas mutaciones tienen un innegable efecto activador en la capacidad contráctil de las células, manifestada como la capacidad de formar adhesiones focales. Por tanto, nos planteamos investigar la capacidad de estas mutaciones, particularmente Y142F, para restaurar la funcionalidad de una forma de RLC incapaz de activarse por la vía canónica, esto es, fosforilándose en T18+S19. Para ello, generamos los mutantes T18AS19A+Y142F (AA-142F) y T18AS19A+Y155F (AA-155F). Tanto el mutante AA como el AA-142F se localizaban débilmente en filamentos, mientras que el mutante AA-155F aparecía completamente difuso (**Figura R24**).



**Figura R24. Los mutantes Tyr con T18/S19 mutado a AA no localizan en los filamentos.** Imágenes representativas de células CHO.K1 transfectadas con los mutantes indicados de RLC (o la forma salvaje, *wild type*) marcadas con GFP y adheridas sobre fibronectina (2µg/ml) durante 2h. Las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con anticuerpos específicos y faloidina fluorescente para visualizar vinculina y F-actina, respectivamente. Las imágenes son representativas de >300 células examinadas en tres experimentos independientes. Barras de escala=10µm.

Por otra parte, ninguno de los mutantes AA tuvo ningún efecto significativo en experimentos de sobreexpresión y no eran capaces de rescatar significativamente el defecto causado por el silenciamiento del endógeno de forma comparable a la forma salvaje. (**Figura R25A-D**). Estos datos confirman que la función de los residuos T18/S19 y de las dos Tyr son independientes y separables: los primeros controlan la activación de la NMII en filamentos, mientras que Tyr155 controla la incorporación de la RLC a la NMII.





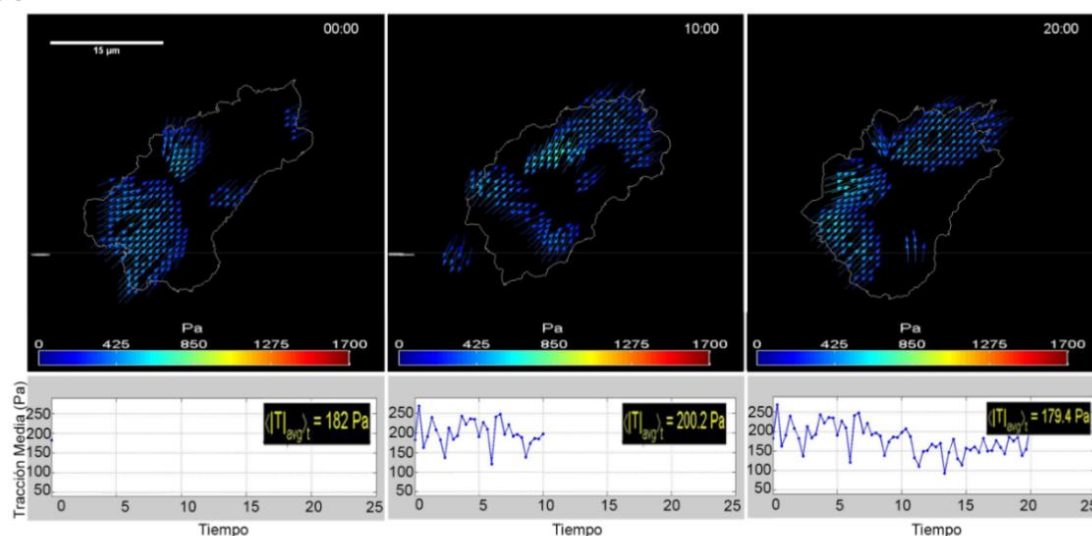
**Figura R25. Los mutantes Tyr con T18/S19 mutado a AA no restauran el número y tamaño de las adhesiones.** Cuantificación del número y superficie adhesiva de células transfectadas con los mutantes indicados de RLC (A-B) o co-transfectadas con pSUPER-RLC y los mutantes indicados de RLC-GFP (o la forma *wild type*) (C-D). Después de 24h (A-B) o 72h (C-D), las células se adhirieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2µg/ml), se visualizó vinculina endógena como marcador fiduciario de las adhesiones y se cuantificaron los parámetros indicados como se indica en materiales y métodos de n=30 por condición. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s., no significativo.

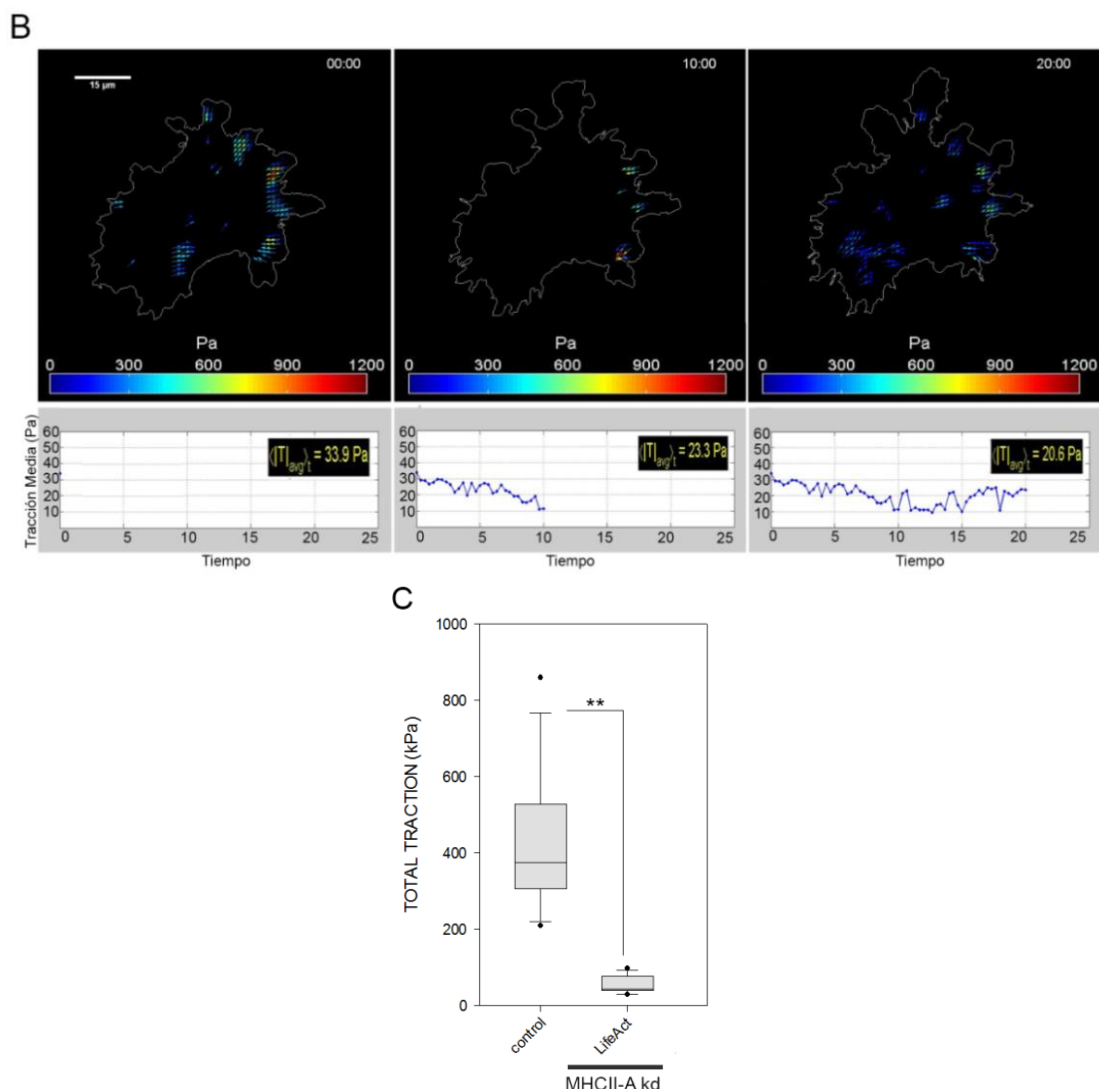
## Parte 2

### 4.2.1. Los parálogos NMII-A y NMII-B contribuyen diferencialmente a la generación y transmisión de tracción de células CHO.K1 a sustratos flexibles cubiertos con fibronectina

La NMII es un elemento esencial en la generación de fuerzas de tracción sobre el sustrato (145). Estudios previos han demostrado que los parálogos NMII-A y NMII-B contribuyen diferencialmente a la generación de fuerzas mecánicas que pasan por las adhesiones focales y se transmiten al sustrato (146, 147). El consenso general en el campo es que esta transmisión de fuerza es un elemento esencial en la dinámica de las adhesiones, induciendo su elongación y maduración (144, 148). Para caracterizar en más detalle este proceso, usamos microscopía de fuerza de tracción y análisis cuantitativo del campo de desplazamiento que puede traducirse en la medida de la tracción generada por la célula a través del módulo de Young, que mide la elasticidad del sustrato (121, 149). De acuerdo con observaciones previas (147), observamos que el silenciamiento de NMII-A reduce drásticamente la tracción ejercida por células CHO.K1 adheridas a fibronectina sobre sustratos flexibles de 5 kPa recubiertos con fibronectina, comparada con la tracción ejercida por células control (**Figura R26 y videos suplementarios 1 y 2**).

A



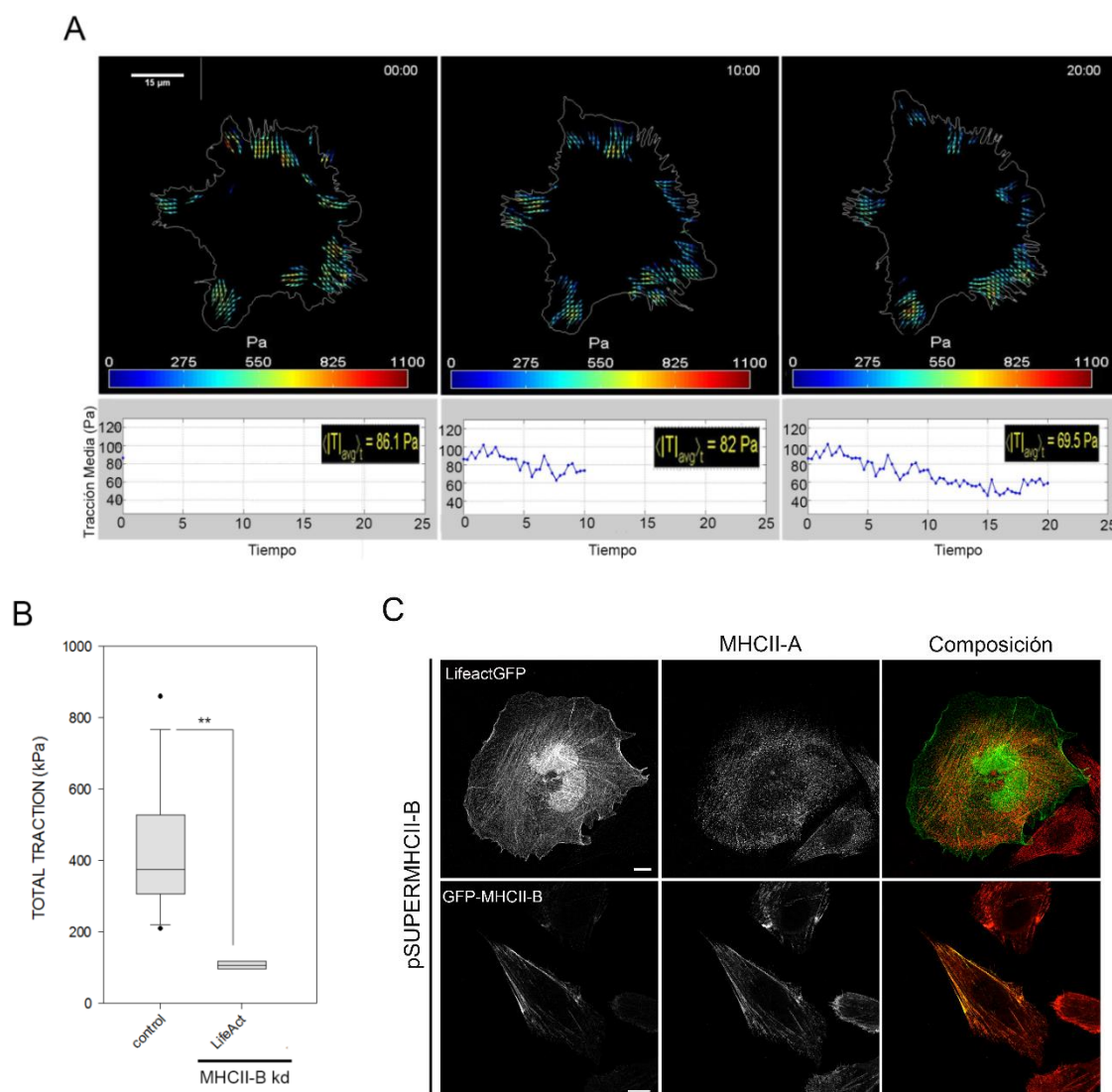


**Figura R26. El silenciamiento de MHCII-A reduce drásticamente la tracción de las células CHO.K1 sobre fibronectina.** Mapas de tracción 2D de células CHO.K1 silenciadas (B) o no (A) para MHCII-A con shRNA durante 72h. El sustrato eran geles flexibles de 5 kPa y  $\approx 120 \mu\text{m}$  de altura recubiertos con fibronectina ( $20 \mu\text{g/ml}$ ). El contorno celular se definió mediante co-expresión de LifeAct-GFP. Las células se adhirieron durante 2h antes de comenzar la filmación. Las imágenes se tomaron cada 20s en un microscopio confocal (ver Materiales y Métodos para los detalles). (C) Cuantificación de las tracciones totales ejercidas sobre el gel a lo largo del vídeo completo, como se indica en materiales y métodos.  $N=25$  células para la condición (A);  $N=23$  células para la (B). La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*\*  $p<0.01$ .

Estos resultados sugieren que la tracción ejercida por la célula depende completamente de NMII-A, y que la tracción residual que se observa en las células silenciadas de MHCII-A se debe a la expresión residual de MHCII-A, ya que el silenciamiento de MHCII-A se comporta de forma dosimétrica, no dominante. Esto

significa que el silenciamiento no completo de MHCII-A causa un fenotipo parcial de eliminación de parte de las fibras de actomiosina, no de su totalidad (56).

Por otra parte, las células CHO.K1 silenciadas para MHCII-B también muestran una gran reducción de la tracción, aunque ligeramente menor que la observada en el caso de silenciamiento de MHCII-A (media II-A=56 ± 22 kPa vs. media II-B=105 ± 21 kPa, **Figura R27A-B y video suplementario 3**). La distribución de la tracción residual ejercida por las células silenciadas para MHCII-B no era polarizada, como en caso del control (**Figura R26A y video suplementario 1**); sino que era relativamente homogénea a lo largo de la periferia de la célula (**Figura R27B**). Es interesante destacar que la distribución de la tracción sobre el sustrato era, de hecho, similar a la distribución de la NMII-A en células en las que se silenció NMII-B (**Figura R27C**).

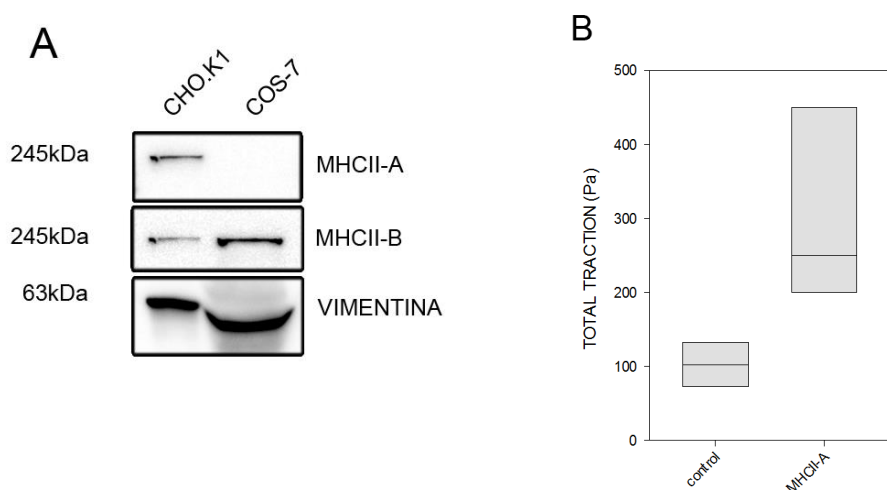


**Figura R27. Reducción de la tracción sobre el sustrato inducida por el silenciamiento de MHCII-B.** (A) Mapas de tracción 2D de células CHO.K1 silenciadas para MHCII-B con shRNA

durante 72h. El sustrato eran geles flexibles de 5 kPa y  $\approx 120 \mu\text{m}$  de altura recubiertos con fibronectina ( $20 \mu\text{g/ml}$ ). El contorno celular se definió mediante co-expresión de LifeAct-GFP. Las células se adhirieron durante 2h antes de comenzar la filmación. Las imágenes se tomaron cada 20s en un microscopio confocal (ver Materiales y Métodos para los detalles). (B) Cuantificación de las tracciones totales ejercidas sobre el gel a lo largo del vídeo completo.  $N=15$ . La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney;  $** p<0.01$ . (C) CHO.K1 transfectadas y tratadas como en (A) se adhirieron a cubreobjetos cubiertos de fibronectina ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) durante 2h y fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos indicados. Las imágenes son representativas de  $>500$  células examinadas en cuatro experimentos independientes. Barras de escala= $10 \mu\text{m}$ .

Estos resultados indican que las células requieren NMII-A para ejercer tracción en el sustrato, pero que la mayor parte del módulo de tracción es ejercido por NMII-B de manera dependiente de NMII-A.

Para confirmar estos resultados, realizamos experimentos similares en células COS-7 (**Figura 28A**), que no expresan MHCII-A (57). Sorprendentemente, y a pesar de expresar grandes cantidades de MHCII-B dispuesta en filamentos, las células COS-7 ejercen una tracción varios órdenes de magnitud menor que las células CHO.K1 en geles de PAA de 5kPa ( $424 \pm 178$  en CHO.K1 vs  $0.12 \pm 0.03$ ). Esta tracción aumentaba cuando estas células expresaban GFP-MHCII-A (**Figura 28B**).

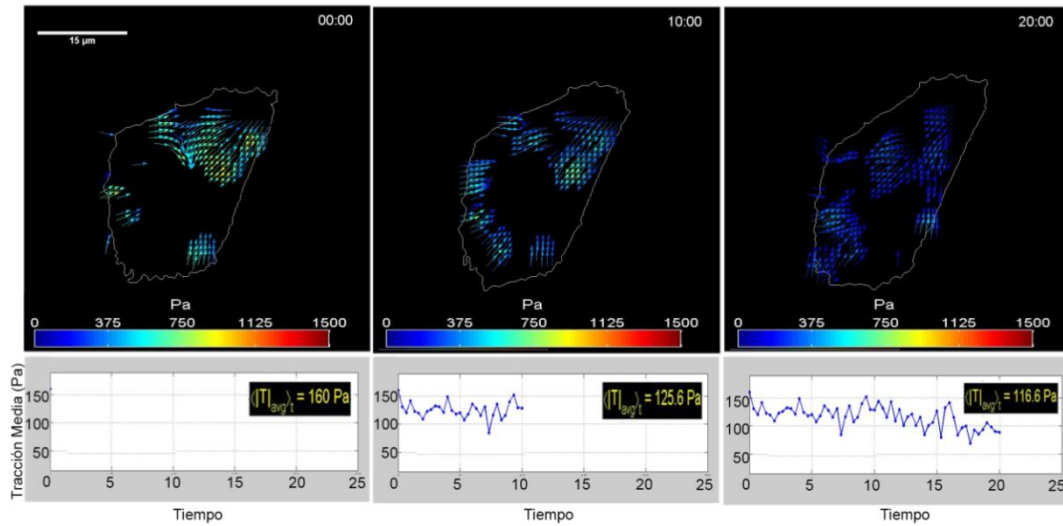


**Figura R28. Las células COS-7 ejercen muy poca tracción sobre el sustrato, que aumenta cuando se expresa MHCII-A.** (A) Lisados de células CHO.K1 y COS-7 fueron separados por PAGE/SDS, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos contra MHCII-A, MHCII-B y vimentina como control de carga (B) Cuantificación de la tracción de células COS-7 sobre geles de 5 kPa recubiertos con fibronectina como se indica en la **Figura R26**.  $N$  (control)=6;  $N$  (MHCIIA)=4.

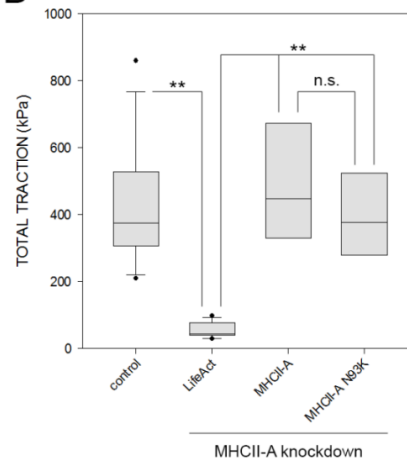
#### **4.2.2. Un mutante deficiente en contracción de MHCII-A restaura la tracción celular y la maduración de las adhesiones de manera dependiente de NMII-B**

En un estudio previo, se demostró que la sustitución de MHCII-A endógena por un mutante deficiente en contracción que causa patología humana (150) restaura la maduración de las adhesiones focales (68). Este mutante, N93K, es incapaz de liberar el fosfato inorgánico después de la hidrólisis de ATP, perteneciendo fuertemente unido a la actina pero mostrando una completa incapacidad de mover los filamentos (150). Esta mutación causa una rara enfermedad humana, denominada anomalía de May-Hegglin que se caracteriza por macrotrombocitopenia, plaquetas grandes y la aparición de inclusiones leucocitarias (16). El efecto de este mutante sobre la maduración de las adhesiones focales se puede explicar por dos posibilidades no excluyentes: una es que la contracción podría no ser necesaria para la maduración de las adhesiones focales; la otra es que el mutante no contráctil podría restablecer la contractilidad de las células. Para estudiar estas dos posibilidades, realizamos experimentos de microscopia de fuerza de tracción en células silenciadas para MHCII-A endógena en las que co-expresamos el mutante N93K. Sorprendentemente, estas ejercían mucha tracción sobre el sustrato, casi el 80% de la tracción en células rescatadas con la forma salvaje de MHCII-A (**Figura R29A-B y video suplementario 4**).

A



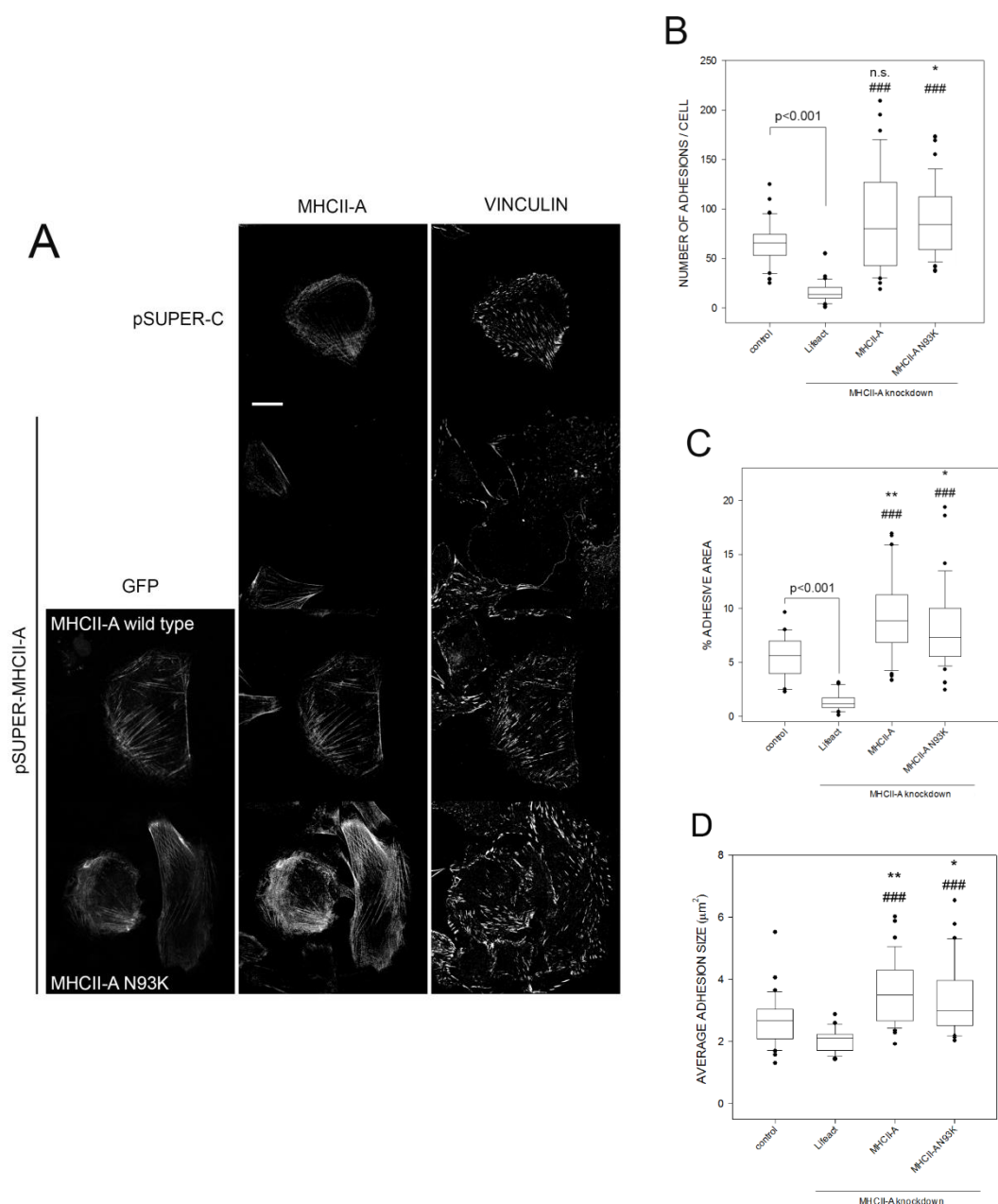
B



**Figura R29. Las células silenciadas de MHCII-A endógena generan tracción sobre el sustrato cuando expresan el mutante N93K.** (A) Mapas de tracción 2D de células CHO.K1 silenciadas para MHCII-A co-expresando GFP-MHCII-A N93K. Ver Materiales y Métodos para los detalles experimentales. (B) Cuantificación de la tracción ejercida sobre el gel de las células tratadas en (A). Control, N=25; MHCII-A KD+ Lifeact, N=23; KD+ GFP-MHCIIA *wild type*, N=8; KD+GFP-MHCIIA N93K, N=9). La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*\*  $p < 0.01$ ; n.s., no significativo.

En términos de maduración de las adhesiones focales, la expresión de este mutante promovió una restauración completa de las mismas usando varias métricas (número de adhesiones, superficie celular adhesiva, tamaño de las adhesiones), comparable con la restauración promovida por MHCII-A *wild type* (**Figura R30 A-C**).





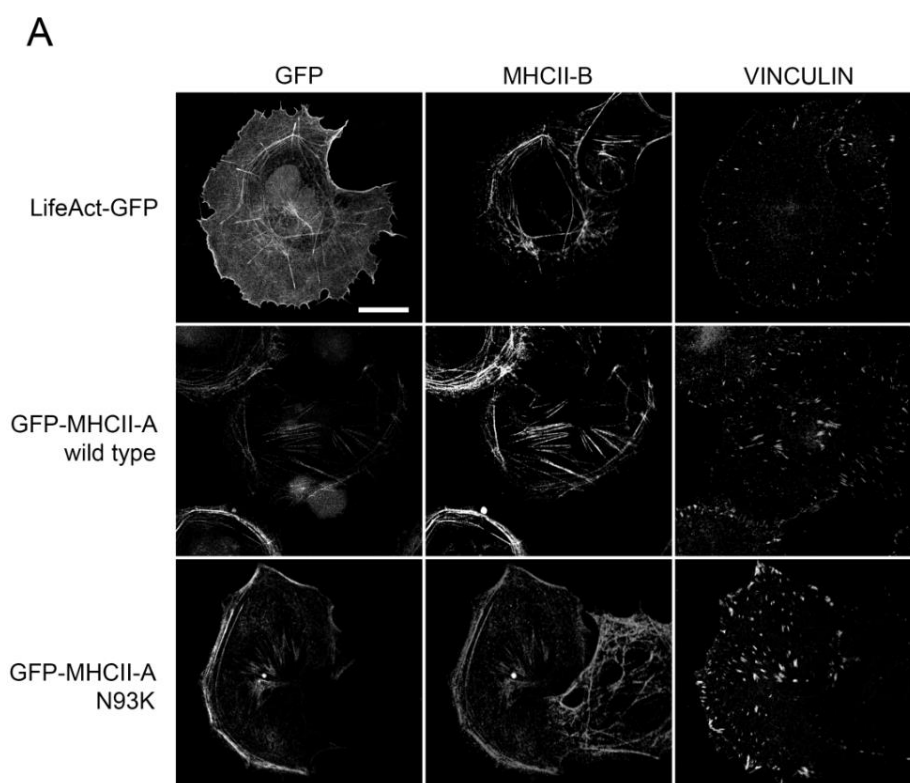
**Figura R30. La expresión de MHCII-A N93K restaura las adhesiones.** (A) Células CHO.K1 co-transfectadas con pSUPER-control o pSUPER-MHCII-A y Lifeact-GFP (sin rescate), GFP-MHCII-A wild type o el mutante N93K. Después de 72h, las células se adhirieron a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2μg/ml), se fijaron y tiñieron con los anticuerpos indicados. Se visualizó vinculina endógena como marcador fiduciario de las adhesiones. Barras de escala=10μm. (B-D) Cuantificación del número de adhesiones (B), porcentaje de superficie celular cubierta con adhesiones (C) y tamaño medio (D) de las adhesiones de las células transfectadas en (A). N=30 células/ condición. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, n.s., no significativo. \*, Significancia vs. Control; #, significancia vs. KD IIA + Lifeact (no rescate).

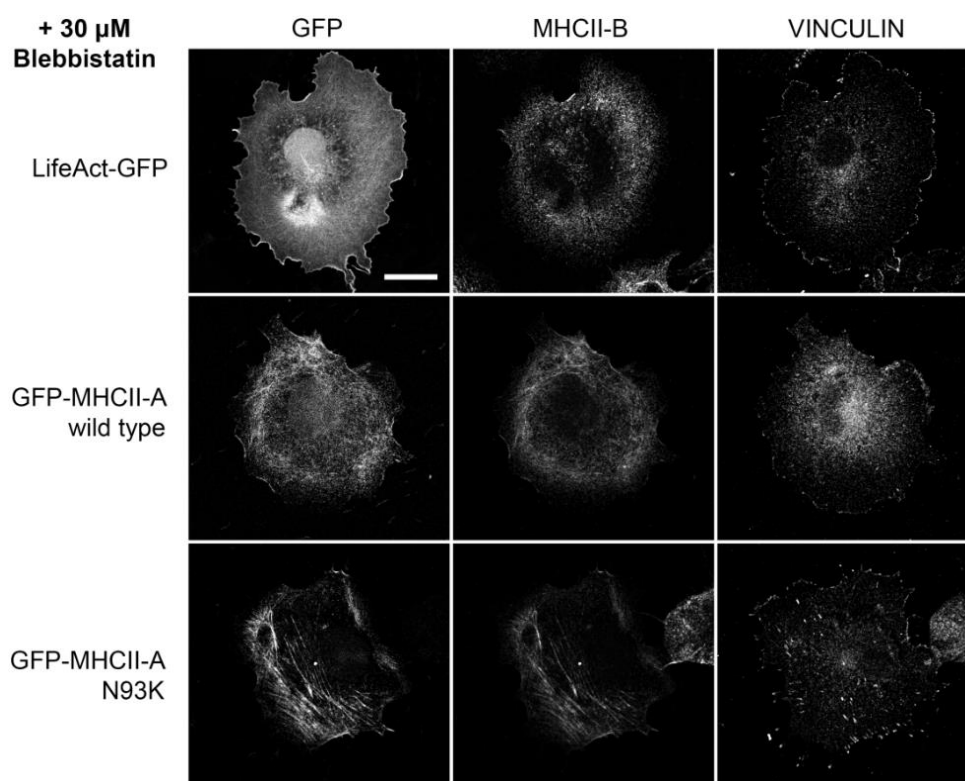


Por el contrario, las células silenciadas para MHCII-A no rescatadas mostraban un número muy reducido de adhesiones elongadas (**Figura R30B-D**), tal y como ha sido previamente publicado en artículos anteriores (57, 63). Estos resultados indican que el mutante no contráctil de MHCII-A N93K restaura la tracción y la maduración de las adhesiones focales.

#### 4.2.3. El mutante N93K MHCII-A promueve la estabilidad del filamento de actomiosina

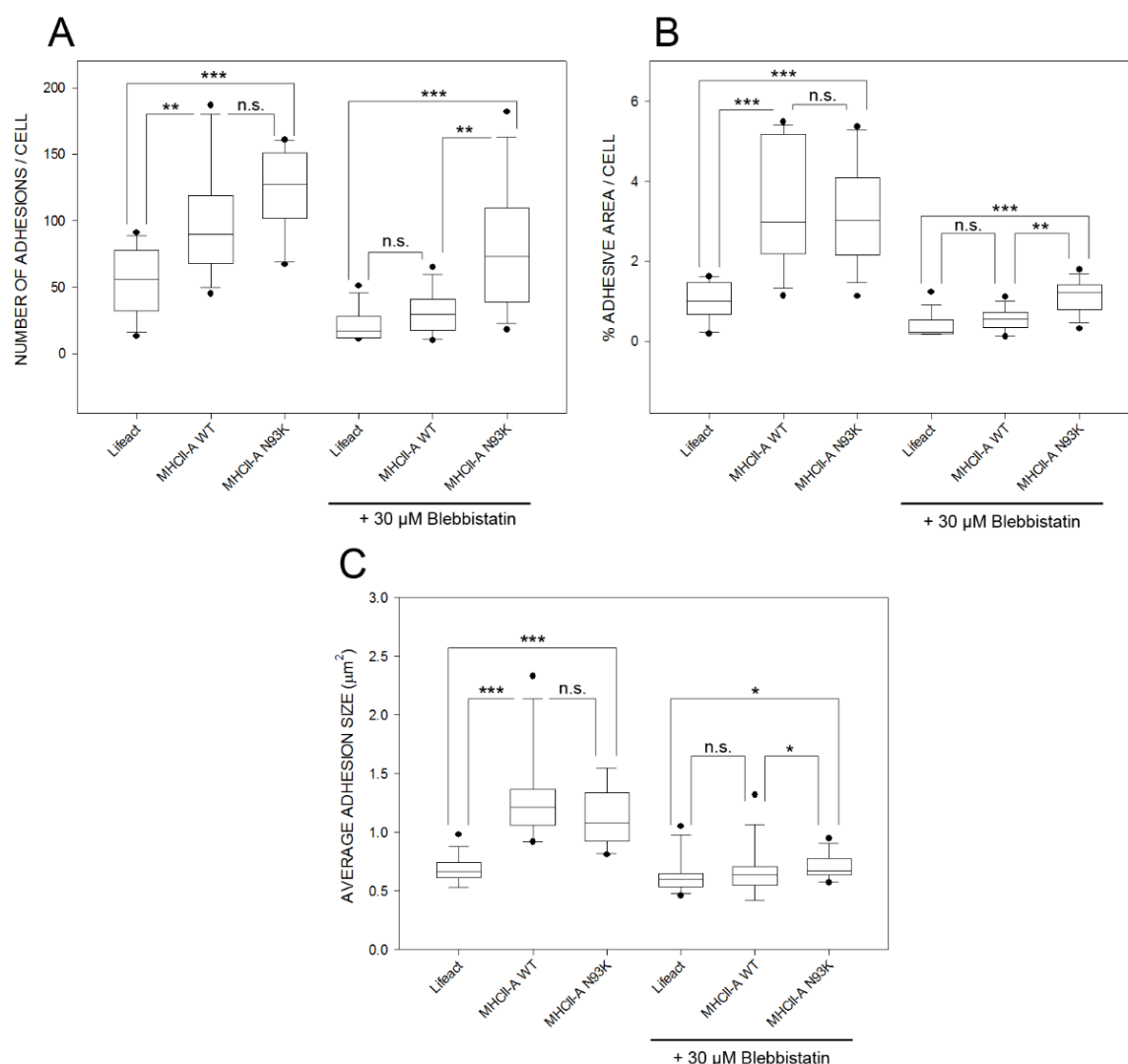
Los datos expuestos anteriormente nos llevaron a plantear la hipótesis de que el mutante confería propiedades adicionales a los filamentos de actomiosina que aumentaban la maduración de las adhesiones, por ejemplo mayor estabilidad. Para estudiar esta hipótesis, comenzamos tratando células COS7 transfectadas con GFP-MHCII *wild type* o el mutante N93K con el inhibidor de NMII blebistatina (151). Los datos mostrados en la **Figura R31** indican que los filamentos que contenían GFP-MHCII-A N93K eran más resistentes al desensamblaje que los filamentos que contenían GFP-MHCII-A *wild type*, lo que sugiere una mayor estabilidad de los filamentos.



**B**

**Figura R31. El mutante N93K es más resistente al desensamblaje inducido por blebistatina que la forma *wild type* de MHCII-A.** Paneles representativos de células COS-7 transfectadas con Lifeact-GFP, GFP-MHCII-A *wild type* o GFP-MHCII-A N93K. Tras 24 h las células fueron resuspendidas, adheridas sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina (2μg/ml) durante 2h y tratadas (B) o no (A) con 30μM blebistatina durante 30min. Posteriormente fueron fijadas y teñidas para las proteínas indicadas. Las células mostradas son representativas de N>200 células examinadas por condición en dos experimentos independientes. Barras de escala=10μm.

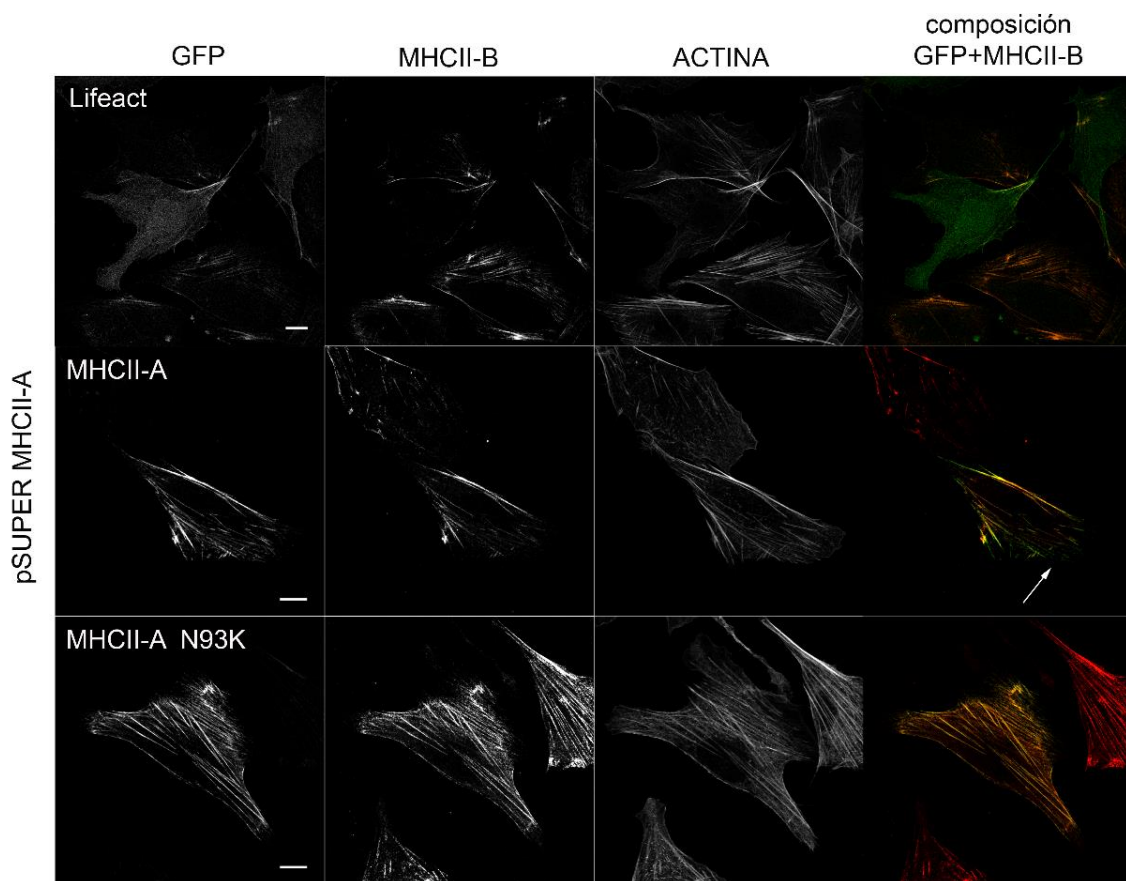
Las tinciones de vinculina que se muestran en la **Fig. R31** también sugieren que las adhesiones asociadas a las fibras que contienen el mutante N93K eran más resistentes a la disolución mediada por blebistatina. Comprobamos este hecho cuantificando varias métricas de las adhesiones focales como se ha indicado anteriormente (**Figura R32A-B**). Estos datos demuestran que el mutante N93K confiere resistencia adicional a las adhesiones focales frente a la desestabilización inducida por el inhibidor blebistatina.



**Figura R32. La estabilidad del filamento dificulta el desensamblaje de las adhesiones.** Cuantificación del número de adhesiones (A), porcentaje de superficie celular cubierta con adhesiones (B) y tamaño medio (C) de las adhesiones de las células mostradas en la **Figura R31**. N=30 células/ condición. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , n.s., no significativo.

#### **4.2.4. El mutante N93K de MHCII-A facilita el ensamblaje de NMII-B, mejora la tracción dependiente de NMII-B y ralentiza el intercambio de componentes adhesivos en adhesiones focales**

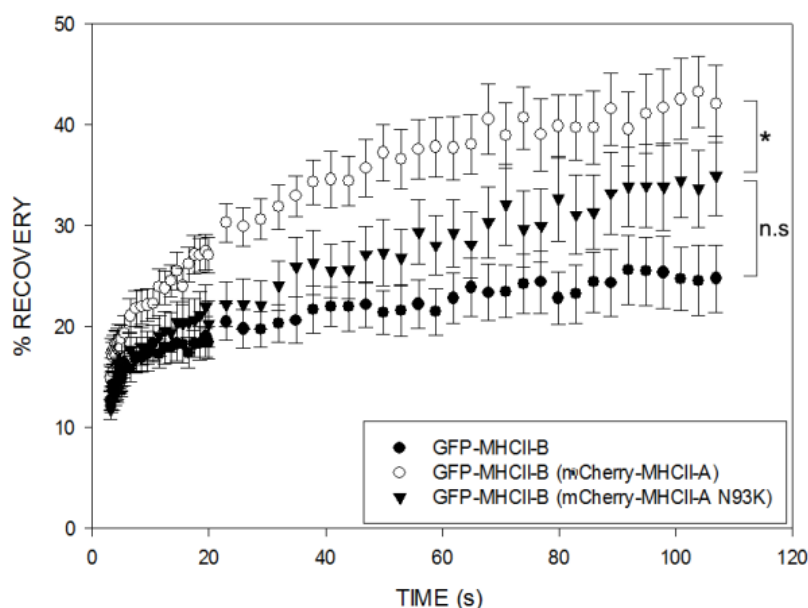
El aumento de la estabilidad de los filamentos que contienen MHCII-A N93K combinado con su intrínseca falta de actividad contráctil nos hizo postular que este mutante podría permitir la transmisión de la tracción generada por NMII-B a las adhesiones. Esto postula además que el ensamblaje de mini-filamentos de NMII-B, que en células CHO.K1 está mediado por NMII-A (56) no requiere la actividad contráctil de esta última. Para comprobar esta posibilidad, teñimos la NMII-B endógena en células con NMII-A silenciadas y rescatadas con GFP-MHCII-A *wild type* o GFP-MHCII-A N93K. Observamos que, de manera similar a la forma *wild type*, el mutante N93K permitía la formación de gruesos haces de actomiosina que contenían NMII-B (**Figura R33**). Es interesante resaltar que el mutante N93K presentaba exactamente la misma localización que NMII-B; no se observaron filamentos del mutante N93K aislados de MHCII-B, como ocurre en las células rescatadas con MHCII-A *wild type* (**Figura R33, flecha**). Esto indica que, aunque la actividad contráctil de NMII-A no es necesaria para catalizar el ensamblaje de NMII-B, sí es necesaria para la generación de mini-filamentos de NMII-A y el ensamblaje de NMII-A en regiones anteriores de la célula. Por el contrario, los mini-filamentos NMII eran muy escasos en células silenciadas para MHCII-A (**Figura R33, primera línea**).



**Figura R33. El mutante N93K permite la formación de mini-filamentos de NMII-B pero no restaura la segregación espacial de los parálogos.** Las células fueron transfectadas con pSUPER-IIA para inhibir la expresión de MHCII-A endógena y co-transfectadas con LifeAct-GFP, GFP-MHCII-A *wild type* o GFP-MHCII-A N93K. Después de 72h, las células fueron adheridas a fibronectina (2µg/ml) durante 2h, fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos. La flecha denota una región frontal donde NMII-A *wild type* se localiza, pero NMII-B no. Esta segregación no se observa en células rescatadas con el mutante N93K. Las células son representativas de >500 observadas en cinco experimentos realizados. Barras de escala=10µm

Conjuntamente con los datos de restauración de la tracción en células silenciadas de MHCII-A que expresaban el mutante N93K (**Figura R29B-C**), postulamos que este mutante era capaz de formar haces de filamentos capaces de transmitir la tracción generada por NMII-B al sustrato. Esto podría deberse a un número de razones, incluyendo una mayor estabilidad de los filamentos de NMII-B, a una mejora de la transmisión de fuerza a través de las adhesiones focales, o a ambos. Para probar la primera posibilidad, realizamos experimentos de foto-extinción (FRAP) en células COS-7 expresando GFP-MHCII-B y MHCII-A o el mutante N93K acopladas a mCherry (**Figura R34**). Estos experimentos revelaron que, en ausencia de NMII-A, la

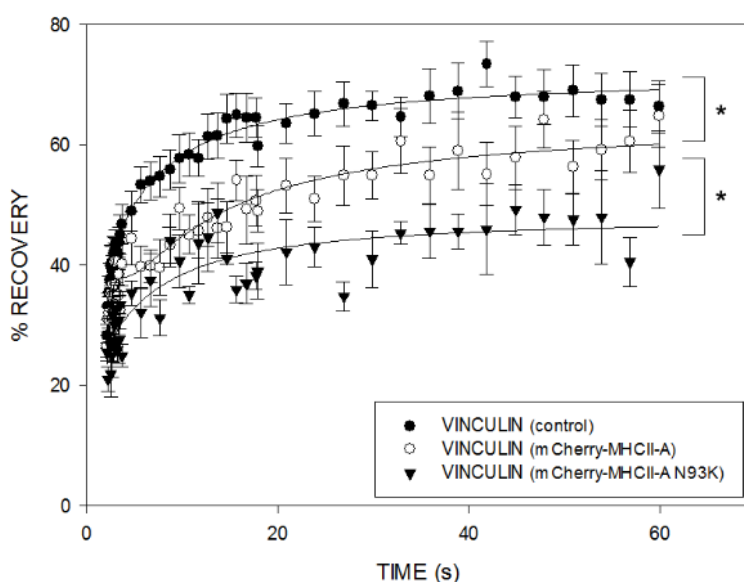
NMII-B se dispone en estructuras que no transmiten tracción al sustrato (**Figura R28**). NMII-A dirige una fracción de NMII-B al sustrato para formar fibras de tensión que generan algo de tracción (**Figura R28**), pero la NMII-B en estas fibras intercambia con la fracción citoplasmática mucho más eficientemente que en ausencia de NMII-A (recuperación del 40% vs. 25% a 90s). Por el contrario, la recuperación de NMII-B en fibras mixtas con el mutante N93K era semejante a la de las células que sólo expresaban NMII-B (**Figura R34**). Estos datos indican que NMII-A dirige la localización de NMII-B a las fibras de tensión de manera independiente de la contractilidad, como se había sugerido anteriormente (**Figura R33**), pero que la forma contráctil de NMII-A produce mini-filamentos de NMII-B menos estables que los generados por el mutante no contráctil de NMII-A.



**Figura R34. El mutante N93K de MHCII-A aumenta la estabilidad de los mini-filamentos de NMII-B comparado con la forma *wild type*.** Se transfectaron células COS-7 con GFP-MHCII-B *wild type* y mCherry-MHCII-A *wild type* o el mutante N93K (o sin co-transfección). Se realizaron experimentos de FRAP de GFP-MHCII-B tras 24h de transfección y 2h de adhesión a cubreobjetos recubiertos con fibronectina. Los datos son la media  $\pm$  error estándar de 24 medidas en 3 experimentos independientes. La significancia estadística se estableció mediante el test t de Student. \* $p < 0.05$ .

Por otra parte, silenciamos células CHO.K1 de MHCII-A endógena y la reemplazamos con mCherry-MHCII-A *wild type* o el mutante N93K, expresando también GFP-vinculina, que usamos en experimentos de foto-extinción similares a los anteriores, sólo que esta vez extinguimos la vinculina, de manera similar a experimentos

descritos anteriormente (152). Estos experimentos, mostrados en la **Figura R35**, revelaron que la recuperación de fluorescencia de vinculina era más lenta en el caso de las células que expresaban el mutante N93K que en aquellas que expresaban la forma *wild type* de MHCII-A. En conjunto estos datos revelan que la función entrecruzadora de NMII-A estabiliza la NMII-B y genera adhesiones estables; mientras que la función contráctil de la NMII-A mejora la dinámica de los filamentos y el intercambio de componentes de las adhesiones focales.



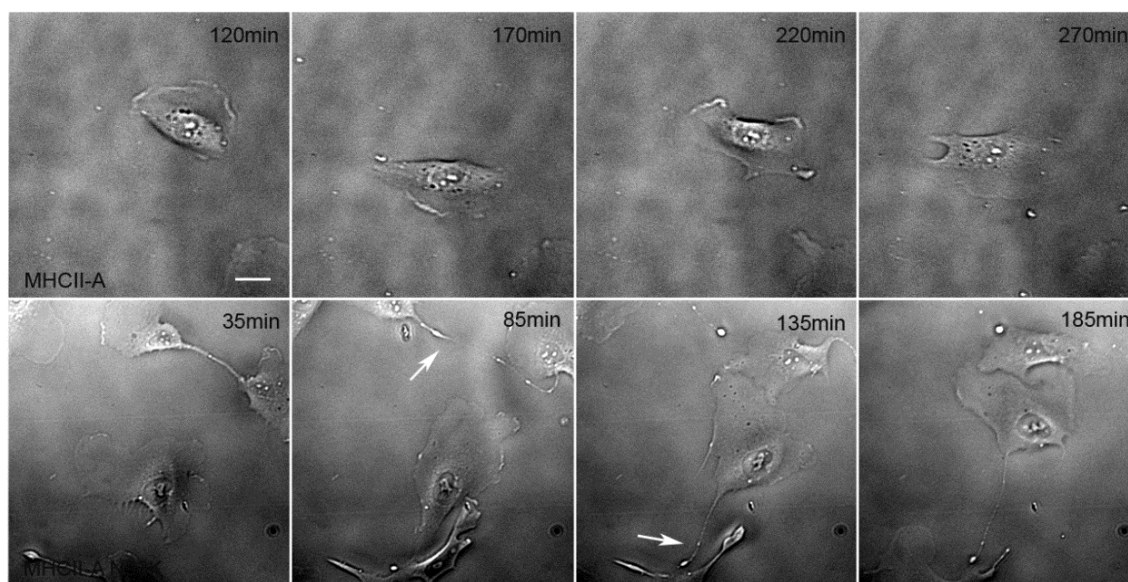
**Figura R35. El mutante N93K de MHCII-A aumenta la estabilidad de las proteínas que forman las adhesiones focales.** Se transfectaron células CHO.K1 silenciadas de MHCII-A con GFP-vinculina y mCherry-MHCII-A *wild type* o el mutante N93K. Se realizaron experimentos de FRAP de la GFP tras 24h de transfección y 2h de adhesión a cubreobjetos recubiertos con fibronectina. Los datos son la media  $\pm$  error estándar de 24 medidas en 3 experimentos independientes. La significancia estadística se estableció mediante el test t de Student. \*p<0.05.

#### 4.2.5. NMII-A no contráctil no restaura la retracción de la parte posterior de la célula durante la migración celular

Las células deficientes en NMII-A muestran una inhibición de la maduración de la adhesión y una pérdida global de polarización, que incluso causa una pérdida de coherencia citoplásmica (63, 64, 153). Sin embargo, una fracción de células silenciadas para MHCII-A también sufría una retracción ineficiente de la parte posterior de la célula, dando como resultado células híper-polarizadas a medida que las células migraban (63, 154). Dado que el mutante N93K restablecía la maduración de las



adhesiones, decidimos comprobar si también restauraba la retracción del polo posterior de la célula. Para ello, se silenció MHCII-A endógena en células CHO.K1 que co-expresaban el mutante GFP-MHCII-A N93K (se seleccionaron las células positivas para el mutante por citometría preparativa) y se las hizo migrar sobre fibronectina durante 6h. En comparación con las células rescatadas con GFP-MHCII-A *wild type*, las células que expresaban GFP-MHCII-A N93K mostraban polos posteriores anormalmente elongados (**Figura R36 y videos suplementarios 5 y 6**), similares a los polos posteriores de células silenciadas de MHCII-B sin rescatar (63).



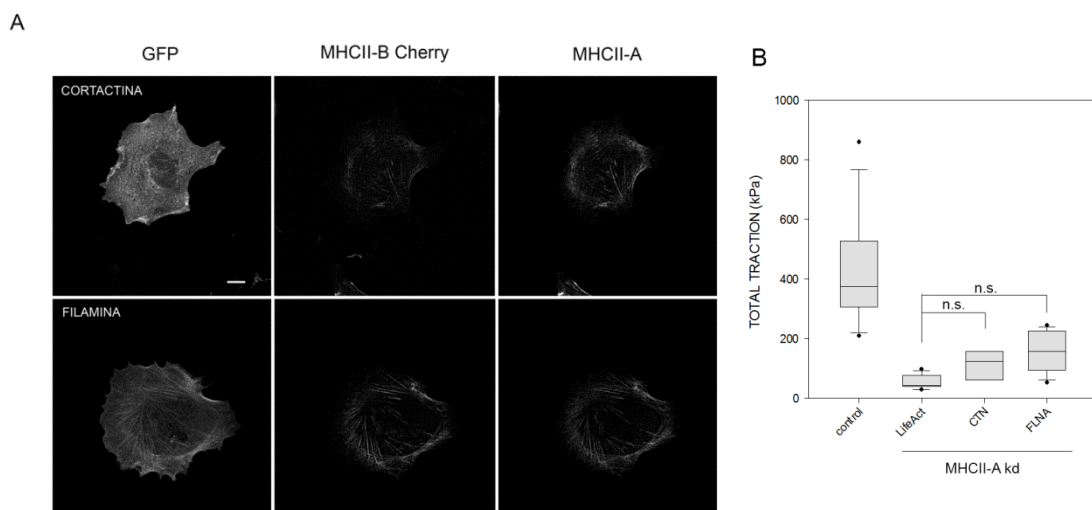
**Figura R36. El mutante N93K de MHCII-A no restaura la retracción del polo posterior de las células migratorias.** Se transfectaron células CHO.K1 con pSUPER-IIA para inhibir la expresión MHCII-A endógena, junto con GFP-MHCII-A *wild type* o GFP-MHCII-A N93K. Después de 72h, las células fueron seleccionadas por citometría preparativa con arreglo a la expresión de GFP; adheridas a cubreobjetos con fibronectina (2µg/ml) y filmadas mediante microscopía de tiempo retardado durante 12h. Las flechas denotan polos posteriores anormalmente alargados en células migratorias, que están ausentes en la mayor parte de los controles. Los videos son secuencias representativas de 24 videos por condición capturados en tres experimentos independientes.

Estos experimentos confirmaron que el mutante N93K no era capaz de restablecer la retracción del polo posterior indicando que la contracción específicamente dependiente de NMII-A es necesaria para la retracción del polo posterior durante la migración de tipo mesenquimal.



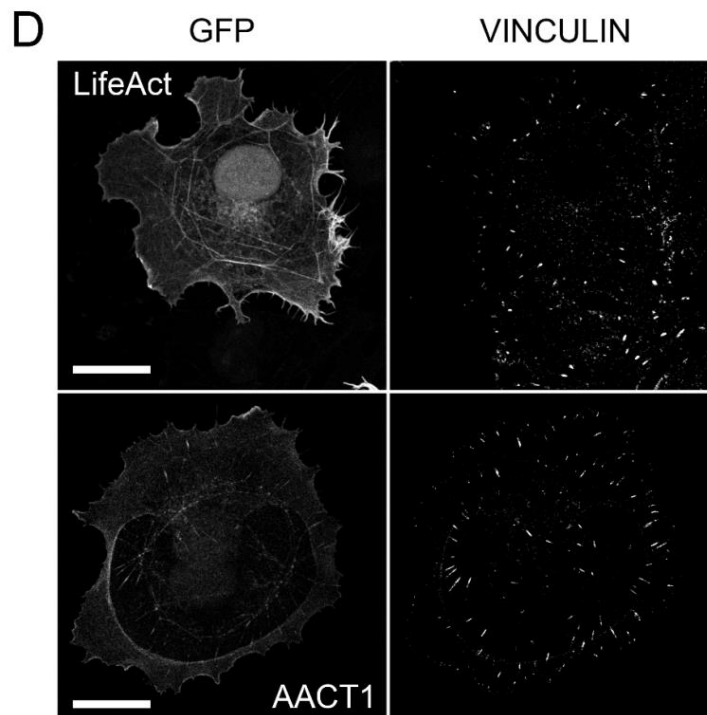
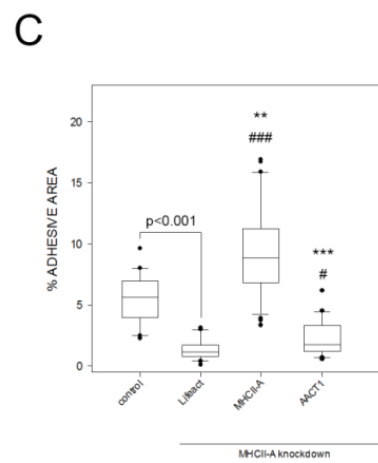
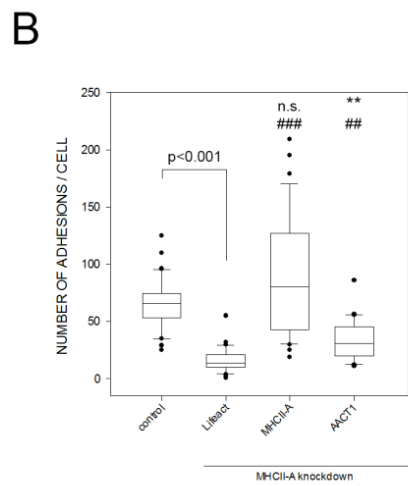
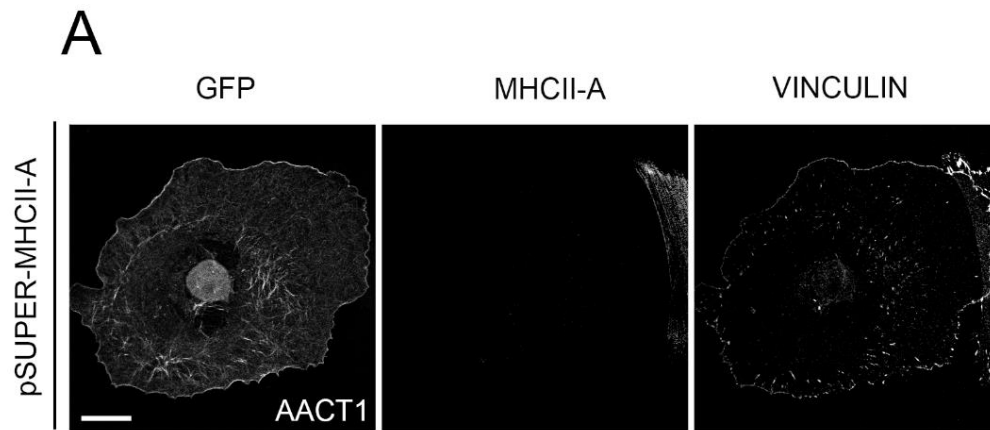
#### **4.2.6. $\alpha$ -actinina promueve la elongación de la adhesión en ausencia de NMII-A pero no soporta la transmisión de fuerza para la tracción celular**

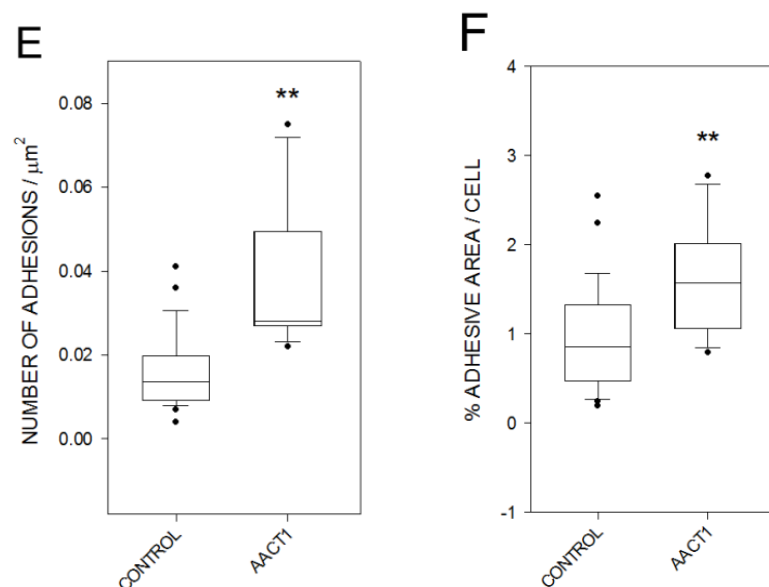
Los datos obtenidos usando el mutante N93K sugieren que la actina entrecruzada es capaz de transmitir la fuerza mecánica generada por motores contráctiles incluso a distancia. Para comprobar este extremo, decidimos silenciar MHCII-A y estudiar la tracción generada por NMII-B en presencia de entrecruzamiento de actina adicional. Debido a que las células expresan muchas moléculas distintas capaces de entrecruzar F-actina, seleccionamos cuatro representantes de familias distintas: cortactina (CTN), que se une fundamentalmente a actina dendrítica; filamina A (FLNA), que forma redes ortogonales de actina;  $\alpha$ -actinina-1 (AACT1), que forma haces anti-paralelos; y tropomiosina-1 (TPM1), que forma haces anti-paralelos y que regula la unión de la miosina II muscular a la actina en tejido muscular, pero no en células no musculares. En primer lugar, expresamos GFP-CTN en células CHO.K1. De acuerdo con observaciones previas, observamos que CTN no se localiza en fibras, sino que decora la actina que forma los lamelipodios celulares (**Figura R37A**)(104). Además, su expresión en células silenciadas de MHCII-A no causaba un aumento en la tracción transmitida al sustrato (**Figura R37B**). Por otra parte, FLNA, también se localizaba en lamelipodios, pero sí tenía haces de filamentos (**Figura R37A**). Sin embargo, la expresión de GFP-FLNA en células desprovistas de NMII-A no aumentaba la tracción (**Figura R37B**), lo que indica que FLNA no transmite la tracción generada por NMII-B.



**Figura R37. Los entrecruzadores de actina cortactina y filamina no transmiten tracción en células silenciadas para NMII-A.** (A) Se transfectaron células CHO.K1 con GFP-CTN o FLNA-GFP junto con mCherry-MHCII-B. Tras 24h, las células fueron adheridas a fibronectina (2 $\mu$ g/ml) durante 2h, fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo específico para MHCII-A. Las células son representativas de >200 observadas en dos experimentos realizados. Barras de escala=10 $\mu$ m (B) Cuantificación de las tracciones totales ejercidas de células silenciadas para MHCII-A en las que se co-expresó GFP-CTN o FLNA-GFP sobre geles flexibles de 5 kPa recubiertos con fibronectina como en los casos anteriores. N=25 células (control); N=23 (silenciamiento + Lifeact-GFP); N=8 (silenciamiento + GFP-CTN); N=11 (silenciamiento + FLNA-GFP). La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; n.s., no significativo. No existen diferencias significativas entre las diversas condiciones de silenciamiento.

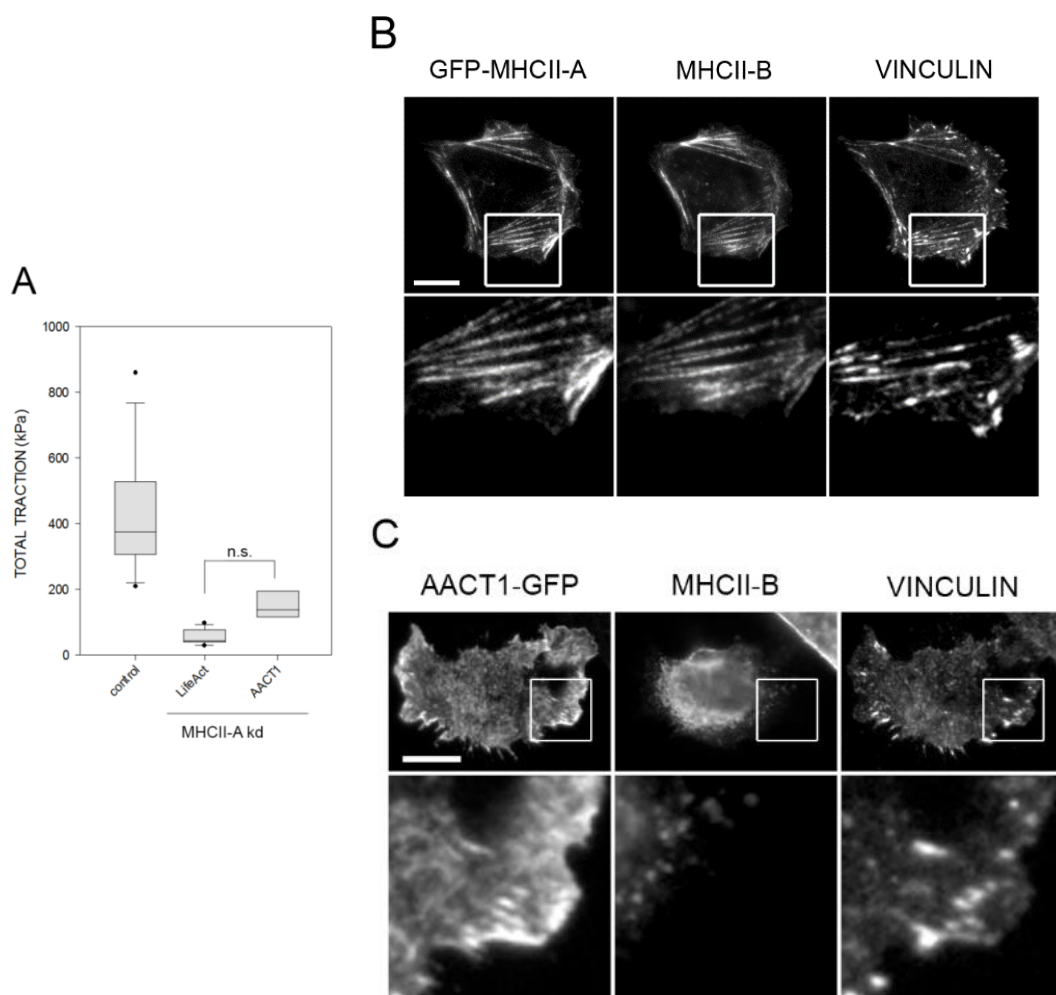
A continuación, evaluamos la localización y el efecto sobre la tracción de  $\alpha$ -actinina. Observamos que incluso en ausencia de NMII-A, la expresión de  $\alpha$ -actinina-1-GFP promovía un aumento leve, pero significativo, en el número de adhesiones y en el área adhesiva de las células analizadas, tanto en células CHO.K1 silenciadas de NMII-A (**Figura R38A-C**) como en COS-7, que no expresan MHCII-A (**Figura 38D-E**). Sin embargo, no afectaba al fenotipo general causado por el silenciamiento de NMII-A, que implica un incremento en el área celular.





**Figura R38.  $\alpha$ -actinina-1 promueve un modesto restablecimiento de maduración de las adhesiones focales.** (A) Panel representativo de la localización y número de adhesiones de células CHO.K1 silenciadas para MHCII-A rescatadas con GFP- AACT1-GFP. Se muestra la localización de la GFP; la tinción de MHCII-A (columna central); y la tinción de vinculina (columna derecha). Las células son representativas de >300 observadas en tres experimentos realizados. Barra de escala=10  $\mu\text{m}$ . (B-C) Cuantificación del número de adhesiones (B) y porcentaje de superficie celular cubierta con adhesiones (C). N=30 células/ condición excepto AACT1, donde N=21. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ , n.s., no significativo. \*, Significancia vs. Control; #, significancia vs. KD IIA + Lifeact (no rescate). (D) Paneles representativos de la localización y número de adhesiones de células COS-7 control (transfectadas con LifeAct-GFP) o expresando AACT1. Las células son representativas de >300 observadas en tres experimentos realizados. Barra de escala=10  $\mu\text{m}$ . Cuantificación del número de adhesiones (D) y porcentaje de superficie celular cubierta con adhesiones (E) en experimentos como el mostrado en (D). N=25 células/ condición. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*\*  $p<0.01$ .

Es interesante destacar que, pese a este leve efecto, la expresión de AACT1-GFP no tuvo un efecto significativo en la generación de tracción medida por TFM (**Figura R39A**). Además, los pequeños haces de actina que contenían AACT1-GFP no se alineaban con NMII-B (**Figura R39B**).

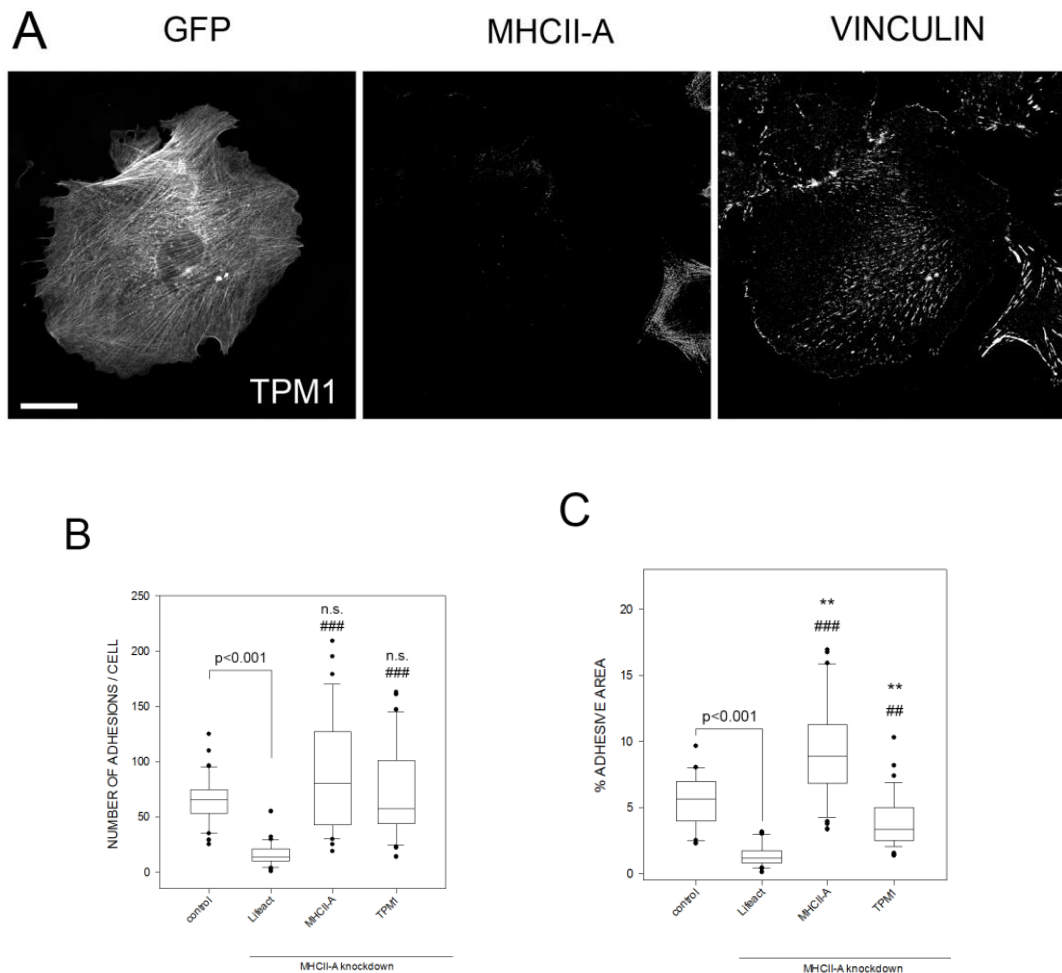


**Figura R39.  $\alpha$ -actinina-1 no compensa la pérdida de MHCII-A para restaurar la tracción celular.** (A) Cuantificación de la tracción ejercida por células tratadas como en la Figura R37A adheridas a geles de 5 kPa recubiertos con fibronectina. N=6 células. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*  $p < 0.05$ ; n.s., no significativo. (B) y (C) Imágenes de reflexión total de fluorescencia en los que se observa la falta de correlación de las distribuciones de AACT1-GFP y NMII-B endógena. Las imágenes son representativas de >100 células examinadas en cinco experimentos independientes. Barras de escala=10 $\mu$ m

Estos datos indican que  $\alpha$ -actinina-1 no compensa la pérdida de la función de la NMII-A ya que no consigue promover el ensamblaje y alineamiento de los mini-filamentos de NMII-B. Sin embargo,  $\alpha$ -actinina-1 sí es capaz de promover la elongación de un pequeño contingente de adhesiones, probablemente de manera independiente de NMII-B y contractilidad.

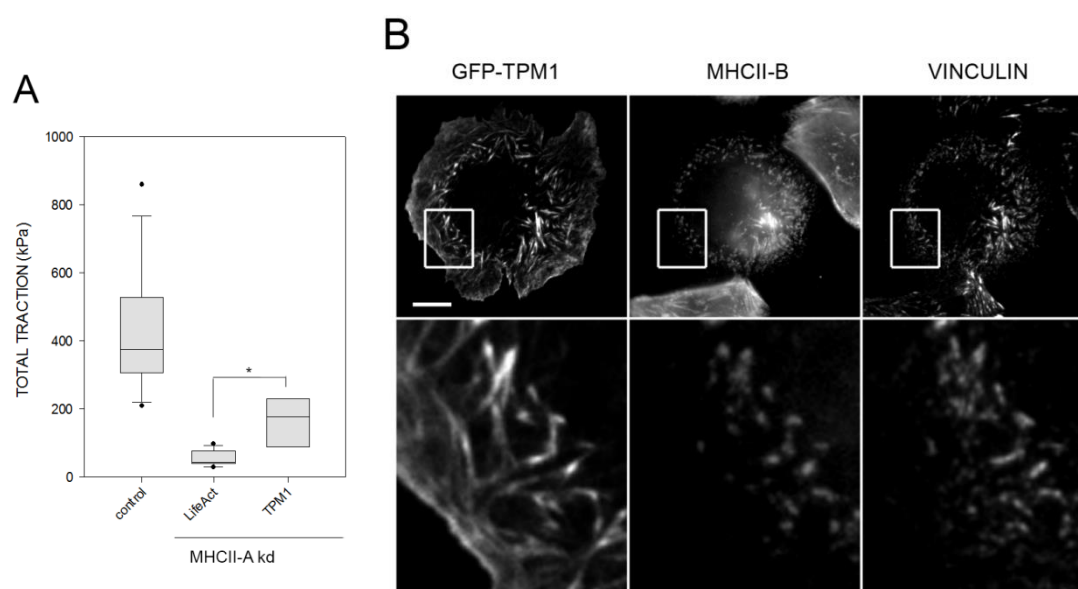
#### 4.2.7. La tropomiosina induce el alineamiento de mini-filamentos de NMII-B para iniciar la maduración de la adhesión y la restauración parcial de la tracción celular

Finalmente, examinamos el efecto de la tropomiosina-1. Sorprendentemente, la expresión de GFP-TPM-1 en células silenciadas para NMII-A promovió un incremento significativo (aunque inferior al rescate con MHCII-A *wild type* o N93K) en el número de adhesiones alargadas en las células examinadas (**Figura R40**).



**Figura R40. TPM1 promueve un restablecimiento significativo del número de adhesiones focales en células deficientes en NMII-A.** (A) Paneles representativos de la localización y efecto sobre las adhesiones de células CHO.K1 silenciadas para MHCII-A co-expresando GFP-TPM1. Se muestra la localización de la GFP; la tinción de MHCII-A (columna central); y la tinción de vinculina (columna derecha). Las células son representativas de >300 observadas en tres experimentos realizados. Barras de escala=10µm (B-C) Cuantificación del número de adhesiones (B) y porcentaje de superficie celular cubierta con adhesiones (C). N=30 células/ condición excepto TPM1, donde N=28. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001, n.s., no significativo. \*, Significancia vs. Control; #, significancia vs. KD IIA + Lifeact (no rescate).

La TPM1 rescataba significativamente el número de adhesiones, pero no tanto el tamaño, lo que indica que las adhesiones eran significativamente más pequeñas que en el control, pero mucho más numerosas que en el caso de los otros rescates, como se aprecia en la tinción de vinculina de la **Figura R40**. Por otra parte, experimentos de TFM revelaron que las células que sobreexpresaban GFP-TPM1 ejercían algo más de tracción sobre el sustrato (**Figura R41A**), y promovían la nucleación de mini-filamentos de NMII-B (**Figura R41B**), que sin embargo eran menores que los de las células control.



**Figura R41. La expresión de TPM1 produce un leve pero significativo aumento de la tracción celular.** (A) Cuantificación de la tracción ejercida por células tratadas como en la Fig. R39A, adheridas a geles de 5 kPa recubiertos con fibronectina. N=6 células. La significancia estadística fue establecida usando el test U no paramétrico Mann-Whitney; \*  $p < 0.05$ . (B) Imágenes de reflexión total de fluorescencia en los que se observa la correlación de las distribuciones de GFP-TPM1 y NMII-B endógena. Las imágenes son representativas de >100 células examinadas en cinco experimentos independientes. Barras de escala=10 $\mu$ m

Estos datos indican que los haces de actina cuyo ensamblaje está mediado por TPM1 son capaces de promover un modesto pero significativo ensamblaje de mini-filamentos de NMII- B que restaura modestamente la capacidad de tracción de las células.

## Discusión



## 5. Discusión

Este estudio se ha centrado en describir dos nuevos mecanismos de regulación de la función de la NMII en la organización de la citoarquitectura de las células mesenquimales. Uno de ellos se basa en la regulación de la interacción de la cadena ligera reguladora con el hexámero de NMII mediante fosforilación en Tyr155, lo que constituye un sistema de control de la estabilidad de la interacción entre la cadena ligera y la cadena pesada independiente de la ruta canónica de activación que depende de la fosforilación en Thr18/Ser19 con el potencial para determinar la biodisponibilidad de NMII para incorporarse a estructuras complejas de actomiosina. El otro mecanismo establece que la estabilidad de los filamentos es un factor que controla la eficiencia de la transmisión de fuerzas contráctiles al sustrato, regulando así la tracción celular y la evolución espaciotemporal de los contactos adhesivos.

### Parte 1.

La fosforilación de proteínas en Tyr, Ser y Thr es uno de los mecanismos de control de la actividad celular más importantes, por lo que está férreamente regulada por un equilibrio entre fosforilación (mediada por proteínas quinasa) y defosforilación (mediada por proteínas fosfatasa). Este equilibrio es crucial para la homeostasis celular y tisular, y su alteración es causa de enfermedades variadas, particularmente cáncer (155). No es sorprendente, por tanto, que esta modificación post-traducciona controla la dinámica del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, la fosforilación en Tyr53 de la actina de la ameba *Dictyostelium discoideum* produce un efecto conformacional que inhibe la polimerización de la actina y desestabiliza los filamentos ya formados (156, 157).

La NMII también se fosforila, y estas fosforilaciones son claves para entender su regulación. A lo largo de más de 40 años de investigación, se han descrito varios núcleos de fosforilación en diversos puntos del hexámero que controlan aspectos esenciales de la función de la NMII. Quizá el amino ácido mejor caracterizado es Ser19 de la cadena ligera reguladora (RLC). La fosforilación de la RLC en Ser19 está mediada por diversas quinasa que incluyen MLCK, ROCK, MRCK y CitK, y es responsable de la desestabilización de la interacción cabeza-cola de las cadenas pesadas que permite su extensión conformacional e inmediato ensamblaje en mini-filamentos (10, 12). Además, esta fosforilación aumenta la actividad ATPasa de la RLC (13), en sinergia con la fosforilación en Thr18 (40). Por su

parte, la fosforilación de Ser1/Ser2 de la RLC hacen a la RLC un sustrato con baja afinidad por las proteínas quinasa que la fosforilan en Thr18/Ser19 (50).

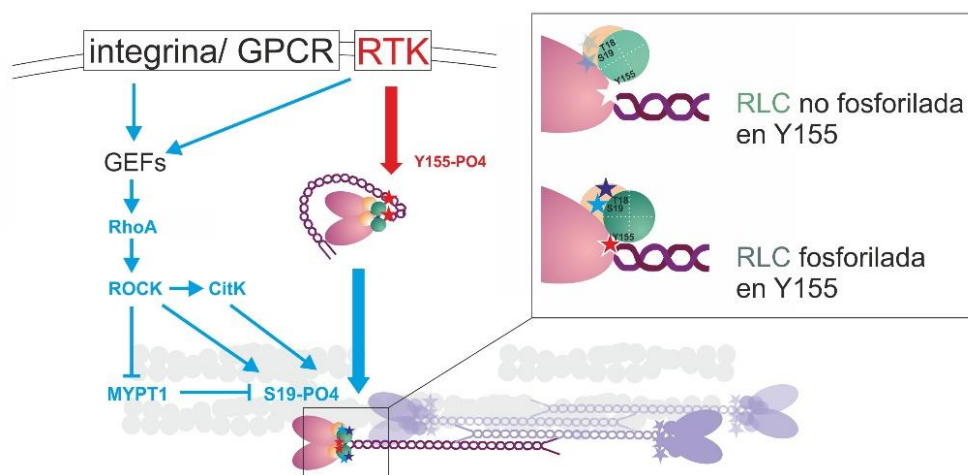
Por otra parte, la estabilidad de los mini-filamentos de NMII se regula también por fosforilación, esta vez de residuos en el dominio C-terminal de las cadenas pesadas (MHCII). El residuo mejor caracterizado de este tipo es Ser1943 en la MHCII-A, que controla la interacción de la NMII-A con S100A4 y es crucial para el mantenimiento de los mini-filamentos de este parólogo (29, 158). Otros residuos importantes en esta región son Ser1935 (MHCII-B), que controla la estabilidad de los haces de filamentos que definen el polo posterior de células migratorias polarizadas (159); Ser1916 (MHCII-A) se fosforila por PKCs y contribuye a la estabilidad de los mini-filamentos de cada parólogo (160). Por otra parte, algunos residuos fosforilables de la región superenrollada, por ejemplo Ser1800, 1803 y 1808 (MHCII-A) también controlan la estabilidad de los filamentos, aunque no está claro si altera la estabilidad de los mini-filamentos o controla la dimerización para la formación de hexámeros funcionales (161). Finalmente, existen otras fosforilaciones en el dominio motor de la MHCII, cuya función está menos caracterizada (27, 162).

## 5.1.1. Mecanismo molecular de estabilización de NMII por fosforilación de RLC en Y155

En este trabajo hemos demostrado que, además de las fosforilaciones descritas en Ser19, Thr18 y Ser1/2, la RLC se fosforila en Tyr. Estas fosforilaciones se describieron en 1983 (128), pero el significado biológico de las mismas era aún una incógnita. Nuestros resultados son compatibles con un modelo en el cual la fosforilación de Y155 favorece la interacción de la RLC con la MHCII, y su defosforilación la dificulta. Esto sugiere que esta fosforilación supone un nuevo nivel de regulación de la actividad de la NMII, que no controla tanto la actividad de la NMII (que depende fundamentalmente de la fosforilación en Ser19) como de la disponibilidad de NMII, facilitada por esta fosforilación.

La baja afinidad del mutante no fosforilable de RLC en Y155 (Y155F) por los fragmentos de tipo meromiosina indica que la RLC fosforilada en Y155 se inserta más fácilmente en la estructura hexamérica (recordemos que estos fragmentos poseen intacta la región de interacción con la RLC y la ELC). Sin embargo, esta fosforilación no es un requerimiento absoluto para la interacción de la RLC con la NMII, ya que el mutante Y155F sí se sitúa en los filamentos de actomiosina cuando se elimina la RLC endógena y se

expresa el mutante. Esto implica que el mutante Y155F tiene menor afinidad que la RLC endógena por el hexámero, no siendo capaz de competir con esta. Sin embargo, los filamentos de actomiosina que contienen el mutante Y155FF no permiten la polarización anteroposterior de las células. Esto significa que, aunque los filamentos se forman, su estabilidad es menor que si contienen la forma salvaje. Proponemos un posible modelo de “llave y cerradura”, que implica que la RLC fosforilada en Y155 “encaja” perfectamente en el hexámero, y permite la conversión 10S→6S dependiente de la fosforilación en Ser19. Esta fosforilación también permitiría la bisfosforilación en Thr18/Ser19, estabilizando los filamentos determinantes de la polaridad anteroposterior. Por su parte la RLC no fosforilada o el mutante Y155F “encajaría” peor en el hexámero, favoreciendo la salida del hexámero del mini-filamento y la posterior disolución del mismo (**Figura D1**). En este sentido, la RLC no fosforilable en Y155 se puede fosforilar en Ser19 (aunque sólo un 30% comparada con la forma salvaje), pero casi no aparece fosforilada en Thr18+Ser19, lo que sugiere que el mutante, aunque funcional, no es capaz de mediar la estabilización de los filamentos involucrados en la polaridad anteroposterior.



**Figura D1. Modelo que representa la posible contribución de la fosforilación de la RLC en Y155 a la funcionalidad de la NMII.** En el modelo, la fosforilación de RLC en Y155 favorece la incorporación de la NMII al filamento y posibilita su fosforilación en T18/S19, siendo necesaria para activación. En el detalle, se observa un esquema simplificado del mecanismo propuesto por el cual la fosforilación en Y155 permite un mejor encaje de la RLC en el dominio de unión de la NMII, facilitando su fosforilación en T18/S19.

Nuestros datos también han confirmado que la RLC es esencial para el correcto plegamiento del hexámero de NMII (142). El estudio de Trybus y Lowey sugiere que, en ausencia de RLC, las cadenas pesadas MHCII-A y MHCII-B son inestables y son degradadas. De acuerdo con esto, las células con RLC silenciadas presentan unos niveles de MHCII-A y MHCII-B inferiores a los controles, causando un defecto generalizado de ausencia de filamentos de actomiosina y maduración de las adhesiones muy similar al observado cuando se eliminan simultáneamente MHCII-A y MHCII-B ((68) y este trabajo). Es interesante destacar que la expresión de la forma salvaje en células silenciadas de RLC endógena rescata completamente la expresión de las cadenas pesadas, pero la expresión del mutante Y155F rescata más completamente la expresión de MHCII-A que la de MHCII-B. Este resultado indica que la MHCII-B requiere una mejor inserción de la RLC para el mantenimiento de la estructura de la NMII-B, lo que además explica que el mutante Y155F no rescate la polaridad anteroposterior, que requiere una graduación de la estabilidad y tamaño de los filamentos de actomiosina desde el frente (más estrechos y cortos) hacia el polo posterior (más anchos y largos)(57, 163).

## 5.1.2. Mecanismo molecular de fosforilación de la RLC en Y155

La detección de la fosforilación del residuo Y155 por espectrometría de masas sugiere que, aunque esta modificación post-traducciona no es la única asociada a los residuos de Tyr (por ejemplo, Tyr se puede modificar por adición de un grupo nitro, NO<sub>2</sub> (164)), sí es el mecanismo predominante de regulación de la RLC a través de este residuo. Por tanto, una cuestión importante se refiere a las posibles proteínas quinasa que utilizan este residuo de la RLC como sustrato de fosforilación. El uso de algoritmos predictivos como Scansite sugirió que las proteínas quinasa de la familia RTK podrían ser posibles reguladores fisiológicos de esta fosforilación *in vivo*. Esta familia incluye varios receptores de membrana para factores de crecimiento, incluyendo los receptores de EGF, IGF, insulina, PDGF, FGF y otros (165). Nuestros datos demuestran que, *in vitro*, la actividad quinasa de estos receptores fosforila RLC en Y155 y que, *in vivo*, al menos dos de estos receptores también median la fosforilación de la RLC en este residuo. Esto indica que este mecanismo relaciona directamente la activación de las células por estos mediadores con la fosforilación en Y155 de la RLC.

En general, los receptores de la familia RTK se localizan de manera uniforme en la membrana apical de las monocapas epiteliales en dominios ricos en colesterol (166, 167).

En células polarizadas, la distribución de estos receptores es asimétrica, localizándose mayoritariamente cerca del frente de avance (168). La unión a su ligando induce la dimerización del receptor, que permite la autofosforilación en *trans* de los dominios quinasa del receptor (140). Esta autofosforilación aumenta la actividad del dominio quinasa y el reclutamiento de los sustratos que son fosforilados. La cinética de fosforilación/defosforilación de los sustratos depende mayoritariamente del equilibrio entre proteínas quinasa y fosfatasa. En el caso de RLC en Y155, EGF/IGF inducen una activación lenta y acumulativa desde el momento de la estimulación hasta las 3h, lo que sugiere que la defosforilación de la RLC en este residuo no es muy eficiente y correlaciona con el posible mecanismo propuesto de interacción de la RLC fosforilada en Y155 con la NMII. De acuerdo con este modelo, la fosforilación de la RLC quedaría protegida de la acción de las fosfatasas, bloqueando la RLC en una conformación en la que interacciona más eficazmente con el hexámero.

Posteriormente, la internalización del receptor contribuye a la inhibición de las rutas de señalización iniciadas por la unión del ligando, contribuyendo también al reciclaje del mismo. Nuestros datos indican que el receptor IGFR1 induce la fosforilación dependiente de ligando de la RLC en Y155 cuando está presente en la membrana plasmática, ya que la inhibición de la internalización (usando un inhibidor de dinamina) aumenta la fosforilación de RLC en Y155. Esto sugiere un modelo en el cual la RLC, libre o asociada ya al hexámero de NMII (aunque con una asociación más lábil), es fosforilada por el receptor de IGF/EGF en la membrana plasmática, uniéndose la RLC al hexámero con alta afinidad y quedando éste preparado para su incorporación a los filamentos de actomiosina a través de la conversión 10S→6S.

A nivel celular, el efecto de esta fosforilación se traduce en una mayor disponibilidad de NMII para formar filamentos (ver sección anterior de la Discusión), lo que también explicaría la mayor fosforilación de la RLC en Ser19 en respuesta a este tipo de estimulación (169) y permite postular un modelo por el cual la activación vía RTK de la NMII está mediada por dos mecanismos: el primero implica la fosforilación directa de RLC en Y155 por el dominio quinasa de los RTK, lo que favorecería la estabilización del hexámero y la fosforilación en Ser19 para su activación; el segundo dependería del incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y/o la activación de GTPasas de pequeño molecular de la superfamilia Ras (fundamentalmente RhoA), que mediarían la fosforilación de la RLC en Ser19 (y Thr18) por la vías descritas en la Introducción, por ejemplo MLCK, ROCK o CitK.

### 5.1.3. Efectos a nivel celular y tisular de la fosforilación en Y155

El principal efecto de la fosforilación de la RLC en Y155 a nivel celular se centra en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales. Esta fosforilación es, como hemos visto, un elemento clave en la estabilización del hexámero de NMII, permitiendo la activación de la NMII y la generación eficiente de fuerza contráctil, cuya transmisión a las adhesiones focales permite la reorganización de la tracción celular. En el contexto bidimensional, esta tracción se traduce en la elongación de los contactos focales, que está muy disminuida cuando se sustituye la RLC endógena con el mutante Y155F. Es importante destacar que el triple mutante fosfomiméticos para T18 y S19 y no fosforilable para Y155 (T18D+S19+Y155F) no es capaz de aumentar el ensamblaje de la NMII tal y como hace el mutante T18D+S19D, lo que indica que la fosforilación en S19 (y T18) no compensa el “inconveniente” estérico de la no fosforilación de Y155, y postula la independencia de la regulación de la RLC por ambos mecanismos.

Aún queda mucho por explorar acerca de la importancia de esta fosforilación a nivel celular. Nuestros datos indican claramente que esta fosforilación es un requisito imprescindible para que NMII-B pueda generar los haces posteriores de actomiosina que definen el polo posterior. Sin embargo, aún no disponemos de datos acerca de su papel en el refuerzo mecanosensible de la acumulación de NMII en las zonas sometidas a tensión externa, por ejemplo en los contactos intercelulares (170), o en los fenómenos de durotaxis mediados externamente, por ejemplo en respuesta a matrices de diferente dureza (61). Podemos predecir que, basándonos en la capacidad limitada de este mutante para fosforilarse en Ser19, la NMII no fosforilada en Y155 podría reclutarse a las zonas de aplicación de fuerza externa, pero no se estabilizaría completamente. De manera similar, esta fosforilación podría ser necesaria para habilitar a la NMII-B para producir movimiento mesenquimal en tres dimensiones. En estos sistemas, la NMII-B se localiza mayoritariamente en el polo posterior de la célula y es necesaria para el movimiento del núcleo (171). Finalmente, datos no publicados de nuestro grupo demuestran que, a diferencia de las células desprovistas de MHCII-A, que no pueden formar contactos normales célula-célula (19), las células que expresan niveles reducidos de MHCII-B forman inicialmente contactos célula-célula, que son sin embargo inestables, no siendo capaces de inhibir la protrusión, lo que conduce a la pérdida de la inhibición por contacto por parte de las células deficientes en NMII-B, particularmente si las células vecinas expresan niveles normales de NMII-B (M. Vicente-Manzanares, datos sin publicar). Por tanto, postulamos que la fosforilación en Y155 es requerida absolutamente para la formación de haces

polarizados de NMII-B que definen la polaridad anteroposterior en células aisladas y la inhibición por contacto en tejidos complejos hechos de células que forman uniones intercelulares estables.

## 5.1.4. Posibles funciones de la fosforilación de la RLC en Y142

El estudio del posible significado funcional de la fosforilación de la RLC en Y142 se ha visto lastrado por la ausencia de un anticuerpo funcional que reconozca esta modificación post-traducciona. Sin embargo, los experimentos que se han llevado a cabo usando un mutante no fosforilable (Y142F), así como experimentos de fosforilación *in vitro* han revelado algunos datos esclarecedores. En primer lugar, la funcionalidad del mutante Y142F sugiere que su función podría ser la opuesta a la de Y155. Aunque su estabilidad en los filamentos de actomiosina (medida por FRAP) es similar a la de la RLC salvaje, su localización es ligeramente diferente, encontrándose mayoritariamente ausente de la lamela, donde la forma salvaje se dispone en mini-filamentos de pequeño tamaño que crecen por nucleación (172). El mutante de RLC Y142F es capaz de aumentar el número de adhesiones, tanto solo como asociado a las mutaciones en T18 y S19 (T18D+S19D+Y142F). La interpretación de este experimento no es enteramente obvia. El mecanismo de acción más probable de esta mutación se centra en una aceleración de la formación de los mini-filamentos de NMII-A y NMII-B, que resultaría en un incremento en la formación de haces de actomiosina capaces de nuclear la elongación de las adhesiones focales, sin afectar necesariamente al intercambio de los mismos medido por FRAP. En este sentido, el triple mutante T18D+S19D+Y142F no genera polaridad anteroposterior dependiente de NMII-B, como es el caso del mutante T18D+S19D (57). De acuerdo a esta hipótesis, la aceleración dependiente de Y142 de la formación de mini-filamentos de NMII conteniendo la mutación T18D+S19D produciría la inmovilización de los mismos, lo que no permitiría la organización gradual de los filamentos que es necesaria para el correcto establecimiento de la polaridad anteroposterior (56, 60, 163). Otro posible mecanismo no excluyente (aún en investigación en el laboratorio) implicaría que los filamentos que contienen RLC Y142F aumentarían la estabilidad de otros entrecruzadores de actina implicados en la elongación inicial de las adhesiones. La posibilidad más clara en este sentido es la  $\alpha$ -actinina, que es un entrecruzador de actina necesario para la elongación de las adhesiones (68), ya que media la transmisión de fuerzas mecánicas a las adhesiones (98).



En cuanto a la identidad de las proteínas quinasa que podrían fosforilar RLC en Y142, Scansite revela que un posible candidato es SRC. SRC tiene una gran importancia en la dinámica de los filamentos de actomiosina como en la de las adhesiones focales asociadas a estos. Esto queda de manifiesto por el hecho de que la inhibición química o genética de SRC inhibe la disolución de las adhesiones focales (75), mientras que la sobreexpresión de v-SRC inhibe la formación de fibras de tensión (173). En este sentido, SRC también participa en la regulación canónica de la NMII vía fosforilación de la RLC en Ser19, ya que SRC fosforila la proteína quinasa ROCK en el residuo Y722, inhibiendo su actividad (174). ROCK promueve la fosforilación de la RLC en Ser19 inhibiendo la fosfatasa de miosina MYPT1 (175) y también directamente (36). En este contexto, la fosforilación de RLC en Y142 vía SRC (que tendría los efectos opuestos al mutante Y142F) potenciaría la inhibición local de NMII, retardando, o incluso inhibiendo, la formación de mini-filamentos y promoviendo, como se ha descrito, la formación de fibras de tensión. Nuestros datos han demostrado que SRC puede fosforilar RLC en Y142 in vitro, como se demuestra usando el mutante Y155F, que sólo puede ser fosforilado en Y142. Es interesante destacar que, a diferencia del residuo Y155 fosforilado, que no es reconocido por anticuerpos que reconocen fosforilación en Tyr, el residuo Y142 fosforilado sí es reconocido.

En resumen, aunque los experimentos presentados no han podido revelar completamente la función de la fosforilación de RLC en Y142, existen indicios fundados que indican que su fosforilación por SRC o una proteína quinasa de la familia SFK podría mediar la inestabilidad de los filamentos de NMII, pudiendo participar en la graduación de los filamentos de actomiosina, inhibiendo o retardando su ensamblaje en la lamela, donde estas estructuras son más pequeñas y dinámicas que en el polo posterior, donde son grandes y estables.

## Parte 2.

Durante múltiples procesos tanto fisiológicos como patológicos, las células reorganizan la arquitectura de la matriz extracelular. Un mecanismo fundamental de reorganización es a través de cambios en la composición bioquímica de la misma, que puede ocurrir por deposición de moléculas adicionales, o por medio de la secreción de enzimas que cambian la composición de las mismas, por ejemplo oxidación del colágeno por lisil oxidasas; o degradación proteolítica por metaloproteasas secretadas o



unidas a la membrana plasmática (revisado en (176)). En este trabajo, nos hemos centrado en un segundo mecanismo, que consiste en la aplicación de fuerzas mecánicas generadas por la contracción de los microfilamentos por la NMII, que “fuerzan” la reorganización de la geometría de la matriz. Este es un proceso que depende críticamente del grado de activación de la NMII (vía fosforilación en Y155, T18/S19 y S1/S2), pero también de la naturaleza del parólogo de NMII implicado. Una visión reduccionista del problema establece que la matriz es reorganizada mecánicamente a través de un mecanismo que tiene un punto de aplicación de fuerza (la adhesión focal) que actúa de vínculo entre la matriz y la célula. La adhesión focal está asociada a haces de microfilamentos que transmiten una fuerza generada “a distancia” por el mini-filamento de NMII. Cuando se usan proteínas recombinantes, este mecanismo implica el movimiento de los filamentos (150); pero en células, la adhesión focal actúa como barrera contra el movimiento de los microfilamentos, convirtiendo la energía del movimiento del microfilamento en tracción que se transmite a la matriz. Este es un proceso complejo que depende de tres factores fundamentales: 1) La naturaleza y “potencia” del motor, que depende del tipo de parólogo y el número de eventos contráctiles que genera, que es proporcional al tamaño del mini-filamento. 2) La eficiencia de la transmisión de la fuerza, que depende de la naturaleza de la estructura transmisora, que consiste en el microfilamento de actina, las proteínas que se asocian lateralmente al mismo, así como el propio mini-filamento de NMII. 3) La disipación de la fuerza en el punto de aplicación, que depende del engranaje del llamado “embrague molecular adhesivo”. Un engranaje acoplado fuertemente transmitirá las fuerzas más eficazmente que un engranaje mal acoplado, en el que la fuerza se disipará a través de asociaciones lábiles (84, 85). Varias moléculas pueden graduar el nivel de engranaje, notablemente talina (177). Mientras que el primer mecanismo descrito en esta Tesis atañe al primer factor, aumentando la “potencia” de los mini-filamentos, en la segunda parte nos hemos centrado en la contribución de la estabilidad del sistema de filamentos de actomiosina a la eficiencia de la transmisión.

Es muy importante estipular que a lo largo del trabajo y como simplificación, hemos adoptado como medida de los efectos biológicos los cambios en el número y/o tamaño de las adhesiones focales. Esto es, claramente, una simplificación experimental, que sólo nos permite extrapolar los efectos en la matriz. Sin embargo, estos resultados

serán comprobados experimentalmente mediante experimentos de visualización de la reorganización de la matriz, que no se han realizado aún.

### **5.2.1. El entrecruzamiento no contráctil de los microfilamentos mejora la transmisión de la fuerza mecánica generada por la NMII y su conversión en tracción.**

Nuestros datos en cuanto a la estabilidad del sistema de filamentos de actomiosina demuestra que la contracción es un mecanismo de desestabilización de la estructura del filamento insertado en la adhesión focal. El mutante de MHCII-A N93K, que permanece fuertemente unido a los microfilamentos, es mucho más estable que la forma salvaje, como lo demuestra su resistencia al desensamblaje por blebistatina (**Figuras. R31 y R32**) y experimentos previos de FRAP (63). Esta estabilidad aumentada se transmite a la composición y dinámica de las adhesiones focales. Así, la proteína vinculina se intercambia más lentamente con la fracción citoplasmática en aquellas adhesiones que están estabilizadas por el mutante N93K que aquellas que están formadas sobre filamentos definidos por la forma salvaje de NMII-A (**Figura R35**). El cambio no es tan dramático como el observado entre N93K y la forma salvaje de MHCII-A (63), pero las implicaciones son mayores. Un modelo consistente con estos datos implica que la estabilidad de los componentes de las adhesiones focales depende de la estabilidad de la NMII. Esta estabilidad actuaría “a distancia”, ya que la NMII-A no se localiza en las adhesiones focales (63, 64).

Es interesante recalcar que el mutante N93K no es capaz de generar fuerza mecánica, como demuestra el hecho de que los filamentos de actina no son propulsados en absoluto en experimentos con proteínas recombinantes (150). Entonces, ¿cómo maduran las adhesiones asociadas a filamentos decorados con N93K? Nuestros datos son compatibles con dos posibilidades:

1) N93K transmite la tracción creada por otros motores moleculares. La molécula candidata más inmediata es NMII-B, que forma mini-filamentos co-alineados con los formados por NMII-A. En este sentido, la NMII-B generaría fuerza, que sería transmitida a través de los filamentos súper-estabilizados por N93K, aumentando el rendimiento neto de aplicación de la tracción de NMII-B a la adhesión. Destaquemos

que la restauración de la tracción en células silenciadas de MHCII-A y restauradas con el mutante N93K es casi del mismo orden que en el caso de la restauración con la forma salvaje. En el caso de la forma salvaje, se transmite la contracción mediada por NMII-B + NMII-A; mientras que en el caso del mutante N93K, se transmite sólo la fuerza generada por NMII-B, pero más eficientemente debido a la estabilidad adicional proporcionada por el mutante.

2) Las adhesiones pueden madurar en ausencia de aplicación de fuerza mecánica. Evidentemente, la aplicación de fuerza mecánica amplifica la maduración. Pero las células COS-7, que apenas ejercen tracción sobre el sustrato, sí son capaces de formar adhesiones focales (aunque proporcionalmente mucho menos numerosas que las generadas por células que expresan los dos parálogos de NMII, NMII-A y NMII-B). Además, datos no incluidos en esta Tesis Doctoral demuestran que células CHO.K1 silenciadas tanto para MHCII-A como MHCII-B endógenas, pero en las que se ha co-expresado el mutante N93K acoplado a GFP también muestran adhesiones focales. En este sentido, la  $\alpha$ -actinina-1 podría mediar un efecto similar. Las estructuras generadas por sobre-expresión de  $\alpha$ -actinina-1 en ausencia de NMII-A producen adhesiones alargadas, sin intervención aparente de NMII-B, que no se alinea con dichas estructuras (**Figura R39**).

Por otra parte, las células COS-7 ejercen una tracción muy pequeña sobre el sustrato (casi 1000 veces menos que las CHO.K1, según las medidas obtenidas mediante TFM). Aunque la transfección de GFP-NMII-A aumenta este valor, el aumento no llega ni mucho menos a los niveles de las células CHO.K1. La explicación de este fenómeno se basa en que, en estas células, NMII-B forma fibras aparentemente no contráctiles, pero muy estables, por lo que es muy probable que la GFP-NMII-A consiga ensamblar una porción muy pequeña de NMII-B endógena, aumentando sólo modestamente la tracción. Por otra parte, sí se observa un cambio en la estabilidad de la NMII-B por FRAP. Sin embargo, la interpretación de estos experimentos tiene que tener en cuenta que las fibras de NMII-B en las que se realizan los experimentos de FRAP son justamente aquellas que se han alineado con las fibras de mCherry-MHCII-A (**Figura R34**).

### 5.2.2. La geometría de la estabilización de la actina es crucial para la maduración de los contactos adhesivos.

Una de las funciones principales de la NMII es el entrecruzamiento de los microfilamentos. Esta función puede ser realizada por múltiples proteínas, generando geometrías diversas que los microfilamentos adoptan en distintos momentos y localizaciones subcelulares. En este sentido, no es sorprendente que la geometría desempeñe un papel fundamental en la estabilidad de las adhesiones. La eliminación de la tracción (mediante la delección de MHCII-A) nos ha permitido delinear la contribución relativa de cada modo de entrecruzamiento a la estabilidad de las adhesiones. Es importante destacar que tanto el entrecruzamiento dendrítico (mediado por ejemplo por cortactina) como el que genera redes ortogonales de actina (filamina) no tiene efecto ni en la generación de tracción ni en la maduración de las adhesiones. Por el contrario, el entrecruzamiento anti-paralelo de la actina sí tiene efecto en la maduración de las adhesiones. Como se ha discutido arriba, AACT1 promueve la elongación de un grupo reducido de adhesiones de manera independiente de NMII-B, con la que los agrupamientos de AACT1 no parecen tener relación. Es probable que este proceso dependa de la interacción simultánea de  $\alpha$ -actinina con los microfilamentos y las integrinas que se localizan en las adhesiones focales, así como otros componentes de los contactos adhesivos, como vinculina. Por otra parte, la **Figura 38D-F** demuestra que la expresión de AACT1 en células COS-7 tiene un efecto muy pronunciado sobre el número de adhesiones de estas células sobre fibronectina, lo que sugiere que AACT1 es capaz de inducir la maduración de las adhesiones sin la participación de NMII-A.

Por otra parte, la TPM1 tiene un efecto muy diferente en las células CHO.K1 silenciadas de MHCII-A y en las COS-7. Mientras que en las CHO.K1 deficientes para NMII-A, la TPM1 restaura la maduración de las adhesiones significativamente y restablece algo de tracción sobre el sustrato, no tiene efecto en las COS-7. Esto es seguramente debido a la formación intrínseca de filamentos no contráctiles de NMII-B en las células COS-7, que no ocurre en las CHO.K1 silenciadas de NMII-A (56). El motivo de esta diferencia no se conoce, pero podría ser debido a algún tipo de adaptación de la NMII-B de las células COS-7 que no existe en las CHO.K1 para formar fibras no contráctiles. De hecho, cuando se elimina NMII-A de las CHO.K1, las células pierden coherencia y la NMII-B forma filamentos muy raramente. Las COS-7, que sí forman filamentos de NMII-B tienen morfologías mucho mayores que las

CHO.K1, pero no tienen pérdida de coherencia (aunque sí son frecuentemente multinucleadas). Por otra parte, las CHO.K1 no contienen los arcos concéntricos de NMII-B que se observan en las COS-7, sino que gran parte de la NMII-B se localiza en los haces de gran tamaño que definen los laterales y el polo posterior de la célula. Esto indica que las COS-7 han desarrollado un mecanismo de ensamblaje lento de filamentos no contráctiles de NMII-B que es suficiente (aunque ineficiente) para mediar la citoquinesis. Por su parte, las CHO.K1 ensamblan la NMII-B de acuerdo a un mecanismo por el que los filamentos de NMII-A agilizan la formación de filamentos de NMII-B. Una posibilidad en este sentido es la existencia de proteínas de asociación a la NMII-B que catalicen la formación de mini-filamentos en COS-7 en ausencia de NMII-A. Esta posibilidad está en estudio en el laboratorio.

### 5.2.3. Segregación molecular de los parálogos de NMII y modelos de enfermedad humana

Nuestros datos demuestran que la segregación de NMII-A y NMII-B observada en diversos modelos celulares (23, 63, 64, 178) requiere la actividad contráctil de NMII-A. Esto es aparentemente contradictorio, ya que la especificidad funcional de los parálogos descansa en el extremo C-terminal, que no se une a la actina (57, 179). Sin embargo, el análisis de los mecanismos de nucleación de mini-filamentos de las diferentes isoformas arroja algo de luz sobre esta posible contradicción. En células que expresan ambos parálogos, la NMII-A es capaz de nuclear mini-filamentos *de novo* en la lamela, que nuclean su crecimiento a través del reclutamiento de subunidades adicionales de NMII-A y NMII-B, formando el característico patrón listado que forman los parálogos y que se ha descrito en varios estudios anteriores (23, 63, 178, 180). De acuerdo con estas observaciones, la contracción de la NMII-A, que se traduce en un ciclo de carga más corto, permite el ensamblaje, pero también el desensamblaje de los mini-filamentos de NMII-A, lo que también se observa en la lamela. Además, la NMII-A posee otros mecanismos para desestabilizar los mini-filamentos formados, por ejemplo la fosforilación en el residuo S1943 (61, 181). Por su parte, la NMII-B, al poseer un ciclo de carga más largo (182), forma mini-filamentos más lentamente y requiere una plataforma más estable para ello (56); a cambio, se une de manera más estable a los microfilamentos y genera estructuras más duraderas, por ejemplo para

definir la polaridad anteroposterior en células migratorias. Esto no significa que las estructuras que contienen NMII-B no puedan desensamblarse. Para ello, hemos definido un mecanismo adicional que depende de la fosforilación de S1935 (159), aunque no hemos podido aún determinar la proteína quinasa implicada en este proceso.

Este trabajo ha establecido además que la cooperación entre NMII-A y NMII-B va más allá de la iniciación de los filamentos específicos de cada parólogo, y que los filamentos de NMII-A pueden conducir la fuerza generada por NMII-B para producir tracción. En este sentido, es notable destacar que este proceso parece polarizado desde el polo posterior hacia el lamelipodio. Esta observación se basa en el hecho de que las fibras que contienen el mutante N93K restablecen la tracción y restauran la maduración de las adhesiones, pero no permiten la retracción del polo posterior, que permanece alargado, tal y como se observa en las células silenciadas de NMII-A (63). Si los filamentos de NMII-A pudiesen conducir bidireccionalmente la fuerza mecánica generada por NMII-B, el extremo posterior podría retraerse. Esto podría no ocurrir si la fuerza generada por la NMII-B no es suficiente para desestabilizar los contactos adhesivos de la cola, que en el caso del mutante, estarían además extra-estabilizados por el bajo índice de desensamblaje del mutante mismo (ver sección anterior de la Discusión). Finalmente, nuestros datos producen un contexto molecular que explica la ausencia de defectos adicionales en los pacientes de síndromes MYH9. En estos pacientes, sólo se ven afectados los órganos y células que bien expresan sólo MHCII-A o bien niveles muy bajos de NMII-B (15). En el resto de órganos, las mutaciones de NMII-A no son lo bastante “severas” a nivel molecular para impedir la transmisión de fuerzas generadas por NMII-B, permitiendo el casi normal desarrollo de estos órganos y tejidos.

# Conclusiones

## 6. Conclusiones

### Parte 1

1. RLC se fosforila en los residuos de Y155 (y también en Y142) por receptores de la familia RTK (IGFR) *in vitro e in vivo*, en respuesta a factores de crecimiento.
2. El silenciamiento de la RLC endógena desorganiza los microfilamentos de actomiosina y disminuye la expresión de MHC- IIA y II-B, impidiendo la formación de adhesiones maduras, o alargadas, e impidiendo el establecimiento de la polaridad anteroposterior.
3. La fosforilación en Tyr155 controla la localización subcelular de la RLC, su incorporación y su estabilidad en los filamentos de actomiosina y por consiguiente permite la elongación de las adhesiones focales permitiendo una migración eficiente.
4. El efecto de la no fosforilación en Y155 tiene un efecto dominante sobre la fosforilación de los residuos canónicos Thr18/Ser19.

### Parte 2

5. La tracción ejercida por la célula depende completamente de NMII-A, pero la mayor parte del módulo de tracción es ejercido por NMII-B de manera dependiente de NMII-A.
6. El mutante no contráctil de MHCII-A N93K restaura la tracción, la formación de filamentos de actomiosina de IIB y la maduración de las adhesiones focales confiriéndole más estabilidad que NMII-A
7. La actividad contráctil de IIA es necesaria para restablecer la retracción del polo posterior de la célula durante la migración de tipo mesenquimal.
8. El papel entrecruzador de la actividad no contráctil de IIA contribuye a la maduración de las adhesiones focales por mecanismos dependientes de la contractilidad de la NMII-B y mecanismos independientes de la contracción.



## Referencias

## 7. Referencias

1. Kühne W. Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität. In: Engelmann W, editor. Leipzig 1864.
2. Engelhardt VA, Lyubimova MN. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature*. 1939;144:668-9.
3. Huxley HE. The mechanism of muscular contraction. *Science*. 1969;164(3886):1356-65.
4. Adelstein RS, Pollard TD, Kuehl WM. Isolation and characterization of myosin and two myosin fragments from human blood platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(11):2703-7.
5. Pollard TD, Korn ED. *Acanthamoeba* myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. *J Biol Chem*. 1973;248(13):4682-90.
6. Pollard TD, Korn ED. *Acanthamoeba* myosin. II. Interaction with actin and with a new cofactor protein required for actin activation of Mg<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase activity. *J Biol Chem*. 1973;248(13):4691-7.
7. Kalhammer G, Bahler M. Unconventional myosins. *Essays in biochemistry*. 2000;35:33-42.
8. Peckham M, Knight PJ. When a predicted coiled coil is really a single alpha-helix, in myosins and other proteins. *Soft matter*. 2009;5:2493-503.
9. Grant JW, Taubman MB, Church SL, Johnson RL, Nadal-Ginard B. Mammalian nonsarcomeric myosin regulatory light chains are encoded by two differentially regulated and linked genes. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1127-35.
10. Craig R, Smith R, Kendrick-Jones J. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature*. 1983;302(5907):436-9.
11. Trybus KM, Huiatt TW, Lowey S. A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(20):6151-5.
12. Trybus KM, Lowey S. Conformational states of smooth muscle myosin. Effects of light chain phosphorylation and ionic strength. *J Biol Chem*. 1984;259(13):8564-71.
13. Adelstein RS, Conti MA. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature*. 1975;256(5518):597-8.
14. Spudich JA. The myosin swinging cross-bridge model. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(5):387-92.
15. Althaus K, Greinacher A. MYH9-related platelet disorders. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2009;35(2):189-203.
16. Seri M, Cusano R, Gangarossa S, Caridi G, Bordo D, Lo Nigro C, et al. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet*. 2000;26(1):103-5.
17. Tuzovic L, Yu L, Zeng W, Li X, Lu H, Lu HM, et al. A human de novo mutation in MYH10 phenocopies the loss of function mutation in mice. *Rare diseases*. 2013;1:e26144.
18. Donaudy F, Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N, Di Stazio M, et al. Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*. 2004;74(4):770-6.
19. Conti MA, Even-Ram S, Liu C, Yamada KM, Adelstein RS. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*. 2004;279(40):41263-6.
20. Tullio AN, Accili D, Ferrans VJ, Yu ZX, Takeda K, Grinberg A, et al. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12407-12.
21. Tullio AN, Bridgman PC, Tresser NJ, Chan CC, Conti MA, Adelstein RS, et al. Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol*. 2001;433(1):62-74.

22. Ma X, Jana SS, Conti MA, Kawamoto S, Claycomb WC, Adelstein RS. Ablation of nonmuscle myosin II-B and II-C reveals a role for nonmuscle myosin II in cardiac myocyte karyokinesis. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):3952-62.
23. Maupin P, Phillips CL, Adelstein RS, Pollard TD. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci*. 1994;107 ( Pt 11):3077-90.
24. Jana SS, Kim KY, Mao J, Kawamoto S, Sellers JR, Adelstein RS. An alternatively spliced isoform of nonmuscle myosin II-C is not regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009;284(17):11563-71.
25. Kelley CA, Adelstein RS. Characterization of myosin II isoforms containing insertions of amino acids in the flexible loop near the ATP-binding pocket. *Biophys J*. 1995;68(4 Suppl):225S.
26. Li Y, Lalwani AK, Mhatre AN. Alternative splice variants of MYH9. *DNA Cell Biol*. 2008;27(3):117-25.
27. Almeida MT, Mesquita FS, Cruz R, Osorio H, Custodio R, Brito C, et al. Src-dependent tyrosine phosphorylation of non-muscle myosin heavy chain-IIA restricts *Listeria monocytogenes* cellular infection. *J Biol Chem*. 2015;290(13):8383-95.
28. Ricketson D, Johnston CA, Prehoda KE. Multiple tail domain interactions stabilize nonmuscle myosin II bipolar filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(49):20964-9.
29. Dulyaninova NG, Malashkevich VN, Almo SC, Bresnick AR. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*. 2005;44(18):6867-76.
30. Even-Faitelson L, Ravid S. PAK1 and aPKC $\zeta$  regulate myosin II-B phosphorylation: a novel signaling pathway regulating filament assembly. *Mol Biol Cell*. 2006;17(7):2869-81.
31. Clark K, Middelbeek J, Dorovkov MV, Figdor CG, Ryazanov AG, Lasonder E, et al. The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett*. 2008;582(20):2993-7.
32. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(11):778-90.
33. Sellers JR. Mechanism of the phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle heavy meromyosin. *J Biol Chem*. 1985;260(29):15815-9.
34. Trybus KM. Filamentous smooth muscle myosin is regulated by phosphorylation. *J Cell Biol*. 1989;109(6 Pt 1):2887-94.
35. Driska SP, Aksoy MO, Murphy RA. Myosin light chain phosphorylation associated with contraction in arterial smooth muscle. *The American journal of physiology*. 1981;240(5):C222-33.
36. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-9.
37. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):130-40.
38. Chew TL, Masaracchia RA, Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil*. 1998;19(8):839-54.
39. Yamashiro S, Totsukawa G, Yamakita Y, Sasaki Y, Madaule P, Ishizaki T, et al. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell*. 2003;14(5):1745-56.
40. Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 1986;261(1):36-9.
41. Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Dobereiner HG, Kieffer N, Bresnick AR, Sheetz MP. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*. 2004;116(3):431-43.

42. Tan I, Yong J, Dong JM, Lim L, Leung T. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell*. 2008;135(1):123-36.
43. Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, et al. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol*. 2004;164(3):427-39.
44. Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*. 2000;150(4):797-806.
45. Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, et al. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*. 1998;394(6692):491-4.
46. Matsumura F, Totsukawa G, Yamakita Y, Yamashiro S. Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26(6):639-44.
47. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273(5272):245-8.
48. Asokan SB, Johnson HE, Rahman A, King SJ, Rotty JD, Lebedeva IP, et al. Mesenchymal chemotaxis requires selective inactivation of myosin II at the leading edge via a noncanonical PLCgamma/PKCalpha pathway. *Dev Cell*. 2014;31(6):747-60.
49. Komatsu S, Ikebe M. The phosphorylation of myosin II at the Ser1 and Ser2 is critical for normal platelet-derived growth factor induced reorganization of myosin filaments. *Mol Biol Cell*. 2007;18(12):5081-90.
50. Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J Biol Chem*. 1987;262(20):9569-73.
51. Juanes-Garcia A, Llorente-Gonzalez C, Vicente-Manzanares M. Non Muscle Myosin II. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer; 2017.
52. Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*. 2005;15(7):371-7.
53. Gomez GA, McLachlan RW, Yap AS. Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends Cell Biol*. 2011;21(9):499-505.
54. Hodges JL, Newell-Litwa K, Asmussen H, Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin IIB activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PLoS One*. 2011;6(8):e24149.
55. Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML. T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol*. 2009;10(5):531-9.
56. Vicente-Manzanares M, Newell-Litwa K, Bachir AI, Whitmore LA, Horwitz AR. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *J Cell Biol*. 2011;193(2):381-96.
57. Vicente-Manzanares M, Koach MA, Whitmore L, Lamers ML, Horwitz AF. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol*. 2008;183(3):543-54.
58. Verkhovsky AB, Svitkina TM, Borisy GG. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol*. 1999;9(1):11-20.
59. Yam PT, Wilson CA, Ji L, Hebert B, Barnhart EL, Dye NA, et al. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol*. 2007;178(7):1207-21.
60. Cramer LP. Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nat Cell Biol*. 2010;12(7):628-32.
61. Raab M, Swift J, Dingal PC, Shah P, Shin JW, Discher DE. Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *J Cell Biol*. 2012;199(4):669-83.

62. Ponti A, Machacek M, Gupton SL, Waterman-Storer CM, Danuser G. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*. 2004;305(5691):1782-6.
63. Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore L, Choi CK, Horwitz AF. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol*. 2007;176(5):573-80.
64. Even-Ram S, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS, Yamada KM. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):299-309.
65. Jacobelli J, Chmura SA, Buxton DB, Davis MM, Krummel MF. A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol*. 2004;5(5):531-8.
66. Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):237-51.
67. Alexandrova AY, Arnold K, Schaub S, Vasiliev JM, Meister JJ, Bershadsky AD, et al. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS ONE*. 2008;3(9):e3234.
68. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol*. 2008;10(9):1039-50.
69. Jay DG. The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. *J Neurobiol*. 2000;44(2):114-25.
70. Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1988;1(9):761-72.
71. Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 2):199-206.
72. Anderson TW, Vaughan AN, Cramer LP. Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2008;19(11):5006-18.
73. Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, et al. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*. 2007;128(3):561-75.
74. Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*. 2005;121(3):451-63.
75. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*. 2004;6(2):154-61.
76. Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, et al. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):977-83.
77. Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol*. 2009;187(5):733-47.
78. Kaverina I, Straube A. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(9):968-74.
79. Anthis NJ, Haling JR, Oxley CL, Memo M, Wegener KL, Lim CJ, et al. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem*. 2009;284(52):36700-10.
80. del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 2009;323(5914):638-41.
81. Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*. 2009;323(5914):642-4.
82. Yoshigi M, Hoffman LM, Jensen CC, Yost HJ, Beckerle MC. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol*. 2005;171(2):209-15.

83. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, et al. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*. 2006;127(5):1015-26.
84. Brown CM, Hebert B, Kolin DL, Zareno J, Whitmore L, Horwitz AR, et al. Probing the integrin-actin linkage using high-resolution protein velocity mapping. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 24):5204-14.
85. Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Storer CM. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science*. 2007;315(5808):111-5.
86. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65.
87. Calderwood DA, Campbell ID, Crichtley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(8):503-17.
88. Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr*. 2011;5(2):199-206.
89. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*. 2000;80(2):853-924.
90. Barua B, Nagy A, Sellers JR, Hitchcock-DeGregori SE. Regulation of nonmuscle myosin II by tropomyosin. *Biochemistry*. 2014;53(24):4015-24.
91. Khaitlina SY. Tropomyosin as a Regulator of Actin Dynamics. *International review of cell and molecular biology*. 2015;318:255-91.
92. Gunning PW, Hardeman EC, Lappalainen P, Mulvihill DP. Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2015;128(16):2965-74.
93. Tojkander S, Gateva G, Schevzov G, Hotulainen P, Naumanen P, Martin C, et al. A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. *Curr Biol*. 2011;21(7):539-50.
94. Wolfenson H, Meacci G, Liu S, Stachowiak MR, Iskratsch T, Ghassemi S, et al. Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices. *Nat Cell Biol*. 2016;18(1):33-42.
95. Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(17):2688-701.
96. Otey CA, Pavalko FM, Burrridge K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol*. 1990;111(2):721-9.
97. Lazarides E, Burrridge K. Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*. 1975;6(3):289-98.
98. Roca-Cusachs P, del Rio A, Puklin-Faucher E, Gauthier NC, Biais N, Sheetz MP. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by alpha-actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(15):E1361-70.
99. Razinia Z, Makela T, Ylanne J, Calderwood DA. Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu Rev Biophys*. 2012;41:227-46.
100. Liu J, Das M, Yang J, Ithychanda SS, Yakubenko VP, Plow EF, et al. Structural mechanism of integrin inactivation by filamin. *Nature structural & molecular biology*. 2015;22(5):383-9.
101. Byfield FJ, Wen Q, Levental I, Nordstrom K, Arratia PE, Miller RT, et al. Absence of filamin A prevents cells from responding to stiffness gradients on gels coated with collagen but not fibronectin. *Biophys J*. 2009;96(12):5095-102.
102. Schiffhauer ES, Luo T, Mohan K, Srivastava V, Qian X, Griffis ER, et al. Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton. *Curr Biol*. 2016;26(11):1473-9.
103. Helgeson LA, Nolen BJ. Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *eLife*. 2013;2:e00884.
104. Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, et al. Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*. 2000;151(1):29-40.
105. Hodge RG, Ridley AJ. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(8):496-510.



106. Machacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 2009;461(7260):99-103.
107. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, et al. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*. 1997;16(11):3044-56.
108. Peng J, Wallar BJ, Flanders A, Swiatek PJ, Alberts AS. Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol*. 2003;13(7):534-45.
109. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 1999;97(2):221-31.
110. Svitkina TM, Borisy GG. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*. 1999;145(5):1009-26.
111. Krause M, Gautreau A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(9):577-90.
112. Laukaitis CM, Webb DJ, Donais K, Horwitz AF. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol*. 2001;153(7):1427-40.
113. Watanabe N, Mitchison TJ. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science*. 2002;295(5557):1083-6.
114. van der Flier A, Kuikman I, Kramer D, Geerts D, Kreft M, Takafuta T, et al. Different splice variants of filamin-B affect myogenesis, subcellular distribution, and determine binding to integrin [beta] subunits. *J Cell Biol*. 2002;156(2):361-76.
115. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods*. 2008;5(7):605-7.
116. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004;22(12):1567-72.
117. Wei Q, Adelstein RS. Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol Biol Cell*. 2000;11(10):3617-27.
118. Wang J, Sanger JM, Kang S, Thurston H, Abbott LZ, Dube DK, et al. Ectopic expression and dynamics of TPM1alpha and TPM1kappa in myofibrils of avian myotubes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2007;64(10):767-76.
119. Cohen DM, Chen H, Johnson RP, Choudhury B, Craig SW. Two distinct head-tail interfaces cooperate to suppress activation of vinculin by talin. *J Biol Chem*. 2005;280(17):17109-17.
120. Breckenridge MT, Dulyaninova NG, Egelhoff TT. Multiple regulatory steps control mammalian nonmuscle myosin II assembly in live cells. *Mol Biol Cell*. 2009;20(1):338-47.
121. Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J*. 2004;86(1 Pt 1):617-28.
122. Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *Methods X*. 2014;1:56-9.
123. Tolic-Norrelykke IM, Butler JP, Chen J, Wang N. Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):C1254-66.
124. Sabass B, Gardel ML, Waterman CM, Schwarz US. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophys J*. 2008;94(1):207-20.
125. Schroeder MJ, Webb DJ, Shabanowitz J, Horwitz AF, Hunt DF. Methods for the detection of paxillin post-translational modifications and interacting proteins by mass spectrometry. *Journal of proteome research*. 2005;4(5):1832-41.
126. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, Wagner L, Xu M, Maynard DM, et al. Open mass spectrometry search algorithm. *Journal of proteome research*. 2004;3(5):958-64.

127. Rosenfeld SS, Xing J, Renner B, Lebowitz J, Kar S, Cheung HC. Structural and kinetic studies of the 10 S $\rightleftharpoons$ 6 S transition in smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 1994;269(48):30187-94.
128. Gallis B, Edelman AM, Casnellie JE, Krebs EG. Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of the myosin regulatory light chain from smooth muscle. *J Biol Chem*. 1983;258(21):13089-93.
129. Webb DJ, Mayhew MW, Kovalenko M, Schroeder MJ, Jeffery ED, Whitmore L, et al. Identification of phosphorylation sites in GIT1. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 14):2847-50.
130. Webb DJ, Schroeder MJ, Brame CJ, Whitmore L, Shabanowitz J, Hunt DF, et al. Paxillin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 21):4925-9.
131. Mayhew MW, Webb DJ, Kovalenko M, Whitmore L, Fox JW, Horwitz AF. Identification of protein networks associated with the PAK1-betaPIX-GIT1-paxillin signaling complex by mass spectrometry. *Journal of proteome research*. 2006;5(9):2417-23.
132. Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 1996;133(6):1403-15.
133. Thebault S, Alexander RT, Tiel Groenesteghe WM, Hoenderop JG, Bindels RJ. EGF increases TRPM6 activity and surface expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(1):78-85.
134. Diaz R, Nguewa PA, Parrondo R, Perez-Stable C, Manrique I, Redrado M, et al. Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC cancer*. 2010;10:188.
135. Aleksic T, Chitnis MM, Perestenko OV, Gao S, Thomas PH, Turner GD, et al. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res*. 2010;70(16):6412-9.
136. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(7):505-16.
137. Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, et al. Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(5):1815-20.
138. Parker JJ, Dionne KR, Massarwa R, Klaassen M, Foreman NK, Niswander L, et al. Gefitinib selectively inhibits tumor cell migration in EGFR-amplified human glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2013;15(8):1048-57.
139. Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3635-41.
140. Baer K, Al-Hasani H, Parvaresh S, Corona T, Rufer A, Nolle V, et al. Dimerization-induced activation of soluble insulin/IGF-1 receptor kinases: an alternative mechanism of activation. *Biochemistry*. 2001;40(47):14268-78.
141. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Myosin light chain mono- and di-phosphorylation differentially regulate adhesion and polarity in migrating cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;402(3):537-42.
142. Trybus KM, Lowey S. The regulatory light chain is required for folding of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 1988;263(31):16485-92.
143. Cremo CR, Hartshorne DJ. Myosins: A Superfamily of Molecular Motors. In: Coluccio LM, editor. Watertown: Springer; 2007. p. 171-222.
144. Gupton SL, Waterman-Storer CM. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*. 2006;125(7):1361-74.
145. Beningo KA, Hamao K, Dembo M, Wang YL, Hosoya H. Traction forces of fibroblasts are regulated by the Rho-dependent kinase but not by the myosin light chain kinase. *Arch Biochem Biophys*. 2006;456(2):224-31.
146. Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*. 2010;466(7303):263-6.



147. Jorrich MH, Shih W, Yamada S. Myosin IIA deficient cells migrate efficiently despite reduced traction forces at cell periphery. *Biol Open*. 2013;2(4):368-72.
148. Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010;26:315-33.
149. Dembo M, Wang YL. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*. 1999;76(4):2307-16.
150. Hu A, Wang F, Sellers JR. Mutations in human nonmuscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function. *J Biol Chem*. 2002;277(48):46512-7.
151. Cheung A, Dantzig JA, Hollingworth S, Baylor SM, Goldman YE, Mitchison TJ, et al. A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):83-8.
152. Wolfenson H, Bershadsky A, Henis YI, Geiger B. Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 9):1425-32.
153. Cai Y, Rossier O, Gauthier NC, Biais N, Fardin MA, Zhang X, et al. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 3):413-23.
154. Cai Y, Biais N, Giannone G, Tanase M, Jiang G, Hofman JM, et al. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J*. 2006;91(10):3907-20.
155. Ptacek J, Snyder M. Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet*. 2006;22(10):545-54.
156. Liu X, Shu S, Hong MS, Levine RL, Korn ED. Phosphorylation of actin Tyr-53 inhibits filament nucleation and elongation and destabilizes filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(37):13694-9.
157. Baek K, Liu X, Ferron F, Shu S, Korn ED, Dominguez R. Modulation of actin structure and function by phosphorylation of Tyr-53 and profilin binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11748-53.
158. Dulyaninova NG, Bresnick AR. The long myosin light chain kinase is differentially phosphorylated during interphase and mitosis. *Exp Cell Res*. 2004;299(2):303-14.
159. Juanes-Garcia A, Chapman JR, Aguilar-Cuenca R, Delgado-Arevalo C, Hodges J, Whitmore LA, et al. A regulatory motif in nonmuscle myosin II-B regulates its role in migratory front-back polarity. *J Cell Biol*. 2015;209(1):23-32.
160. Conti MA, Sellers JR, Adelstein RS, Elzinga M. Identification of the serine residue phosphorylated by protein kinase C in vertebrate nonmuscle myosin heavy chains. *Biochemistry*. 1991;30(4):966-70.
161. Clark K, Middelbeek J, Lasonder E, Dulyaninova NG, Morrice NA, Ryazanov AG, et al. TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *J Mol Biol*. 2008;378(4):790-803.
162. Sosale NG, Rouhiparkouhi T, Bradshaw AM, Dimova R, Lipowsky R, Discher DE. Cell rigidity and shape override CD47's "self"-signaling in phagocytosis by hyperactivating myosin-II. *Blood*. 2015;125(3):542-52.
163. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol*. 1997;136(6):1287-305.
164. Radi R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of chemical research*. 2013;46(2):550-9.
165. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34.
166. Bag N, Huang S, Wohland T. Plasma Membrane Organization of Epidermal Growth Factor Receptor in Resting and Ligand-Bound States. *Biophys J*. 2015;109(9):1925-36.
167. Gao J, Wang Y, Cai M, Pan Y, Xu H, Jiang J, et al. Mechanistic insights into EGFR membrane clustering revealed by super-resolution imaging. *Nanoscale*. 2015;7(6):2511-9.
168. Li H, Yuan X, Tang J, Zhang Y. Lipopolysaccharide disrupts the directional persistence of alveolar myofibroblast migration through EGF receptor. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302(6):L569-79.

169. Betapudi V, Rai V, Beach JR, Egelhoff T. Novel regulation and dynamics of myosin II activation during epidermal wound responses. *Exp Cell Res*. 2010;316(6):980-91.
170. Borghi N, Sorokina M, Shcherbakova OG, Weis WI, Pruitt BL, Nelson WJ, et al. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell-cell contacts upon externally applied stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12568-73.
171. Thomas DG, Yenepalli A, Denais CM, Rape A, Beach JR, Wang YL, et al. Non-muscle myosin IIB is critical for nuclear translocation during 3D invasion. *J Cell Biol*. 2015;210(4):583-94.
172. Verkhovsky AB, Svitkina TM, Borisy GG. Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol*. 1995;131(4):989-1002.
173. Tarone G, Cirillo D, Giancotti FG, Comoglio PM, Marchisio PC. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res*. 1985;159(1):141-57.
174. Lee HH, Tien SC, Jou TS, Chang YC, Jhong JG, Chang ZF. Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 19):3368-77.
175. Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, et al. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol*. 1999;147(5):1023-38.
176. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
177. Elosegui-Artola A, Oria R, Chen Y, Kosmalska A, Perez-Gonzalez C, Castro N, et al. Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nat Cell Biol*. 2016;18(5):540-8.
178. Kolega J. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci*. 1998;111 ( Pt 15):2085-95.
179. Sandquist JC, Means AR. The C-terminal tail region of nonmuscle myosin II directs isoform-specific distribution in migrating cells. *Mol Biol Cell*. 2008;19(12):5156-67.
180. Beach JR, Shao L, Remmert K, Li D, Betzig E, Hammer JA, 3rd. Nonmuscle Myosin II Isoforms Coassemble in Living Cells. *Curr Biol*. 2014;24(10):1160-6.
181. Dulyaninova NG, House RP, Betapudi V, Bresnick AR. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol Biol Cell*. 2007;18(8):3144-55.
182. Kim KY, Kovacs M, Kawamoto S, Sellers JR, Adelstein RS. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *J Biol Chem*. 2005;280(24):22769-75.

## **Anexos**

## 8. Anexos

### 8.1. Información suplementaria

**Video suplementario 1.** Mapas de tracción 2D a lo largo del tiempo de células transfectadas con lifeactGFP. Tras 72h las células fueron resuspendidas y adheridas sobre los geles de PAA durante 1h. Transcurrido este tiempo los videos fueron realizados con un microscopio confocal Leica TCS SP5 II como se indica en materiales y métodos. El vídeo corresponde a la **Figura R26A**.

**Video suplementario 2.** Mapas de tracción 2D a lo largo del tiempo de células silenciadas para MHCII-A y rescatadas con lifeactGFP. Tras 72h las células fueron tratadas como en el **video suplementario 1**. El vídeo corresponde a la **Figura R26B**.

**Video suplementario 3.** Mapas de tracción 2D a lo largo del tiempo de células silenciadas para MHCII-B y rescatadas con lifeactGFP. Tras 72h las células fueron tratadas como en el **video suplementario 1**. El vídeo corresponde a la **Figura R27A**.

**Video suplementario 4.** Mapas de tracción 2D a lo largo del tiempo de células para silenciadas para MHCII-A y rescatadas con MHCII-A N93K. Tras 72h las células fueron tratadas como en el **video suplementario 1**. El vídeo corresponde a la **Figura R29A**.

**Video suplementario 5.** Retracción de la parte posterior de las células silenciadas para MHCII-A endógena y rescatadas con MHCII-A *wild type* unida a GFP. Tras 72h las células fueron resuspendidas, sorteadas para GFP y adheridas sobre cristales con fibronectina durante 1h. Transcurrido este tiempo los videos fueron realizados con un microscopio confocal Leica TCS SP5 II realizando una imagen cada 5min durante 6h. El vídeo corresponde a la **Figura R36**.

**Video suplementario 6.** Retracción de la parte posterior de las células silenciadas para MHCII-A endógena y rescatadas con MHCII-A N93K unida a GFP. Tras 72h las células fueron tratadas como en el **video suplementario 5**. El vídeo corresponde a la **Figura R36**.

## 8.2 Publicaciones relacionadas con este trabajo

**Aguilar-Cuenca R**, Llorente-Gonzalez C, Vicente C, Vicente-Manzanares M. Microfilament-coordinated adhesion dynamics drives single cell migration and shapes whole tissues. *F1000Res*. 2017 Feb 17; 6: 160

Juanes-García, A., J. Chapman, **R. Aguilar-Cuenca**, Cristina Delgado-Arévalo, Jennifer Hodges, Leanna A. Whitmore, Donald F. Hunt, Alan Rick Horwitz, Miguel Vicente-Manzanares. A Regulatory Residue in the Non-Helical Domain of Non-Muscle Myosin II-B Controls Migratory Front-Back Polarity. *Journal Cell Biology Reports*. 2015 April; 209(1):23-32.

**Aguilar-Cuenca R**, Vicente-Manzanares M. Unleashing mesenchymal chemotaxis. *Dev Cell*. 2014 Dec 22; 31 (6): 669-70

**Aguilar-Cuenca R.**, Juanes-García, A. and M. Vicente-Manzanares. Myosin II in Mechanotransduction: Master and Commander of Cell Migration, Morphogenesis and Cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb; 71(3):479-92.

### 8.3 Otras publicaciones

Jorge-Peñas A, Izquierdo-Alvarez A, **Aguilar-Cuenca R**, Vicente-Manzanares M, Garcia-Aznar JM, Van Oosterwyck H, de-Juan-Pardo EM, Ortiz-de-Solorzano C, Muñoz-Barrutia A. Free Form Deformation-Based Image Registration Improves Accuracy of Traction Force Microscopy. PLoS One. 2015 Dec 7; 10 (12): e0144184

Alejandro Suñé-Auñón; Alvaro Jorge-Peñas; **Rocio Aguilar-Cuenca**; Miguel Vicente-Manzanares; Hans Van Oosterwyck; Arrate Munoz-Barrutia. Full L1-regularized Traction Force Microscopy over whole cells. *BMC Bioinformatics*. (En prensa).